

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**DANIELE MARIA FERREIRA**

**Avaliação da atividade gastroprotetora e cicatrizante gástrica da  
ramnogalacturonana isolada da *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen em  
ratas**

**CURITIBA**

**2013**

**DANIELE MARIA FERREIRA**

**Avaliação da atividade gastroprotetora e cicatrizante gástrica da  
ramnogalacturonana isolada da *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen em  
ratas**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

**Orientadora:** Profa. Dra. Cristiane Hatsuko Baggio

**Co-orientadora:** Profa. Dra. Maria Fernanda de Paula Werner

**CURITIBA**

**2013**




Ministério da Educação  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
Setor de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia



## PARECER

A Comissão Examinadora da Dissertação de Mestrado “AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE GASTROINTESTINAL E CICATRIZANTE GÁSTRICA DA RAMNOGALACTURONANA ISOLADA DA *Acmella oleracea* (L.) R.K. JANSEN EM RATAS”, de autoria da pós-graduanda **DANIELE MARIA FERREIRA**, sob orientação da Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cristiane Hatsuko Baggio e composta pelas professoras: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cristiane Hatsuko Baggio (Presidente - Farmacologia - UFPR); Alexandra Acco (Farmacologia – UFPR) e Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Clélia Akiko Hiruma (Laboratório de Produtos Naturais - UNESP), reuniu-se e, de acordo com o Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, a pós-graduanda foi Aprovada. Para a devida publicação o trabalho deverá sofrer as modificações sugeridas, que serão conferidas pela sua orientadora. Em Curitiba, 22 de fevereiro de 2013.

  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cristiane Hatsuko Baggio (Presidente - Farmacologia - UFPR)

  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Alexandra Acco (Farmacologia – UFPR)

  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Clélia Akiko Hiruma (Laboratório de Produtos Naturais - UNESP)



1 **ATA DO JULGAMENTO DA 84ª DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

2 Ao vigésimo segundo dia do mês de fevereiro do ano de dois mil e treze, às nove  
3 horas e trinta minutos, no Anfiteatro nº 13 do Setor de Ciências Biológicas da  
4 Universidade Federal do Paraná, reuniu-se a Comissão Examinadora da Dissertação de  
5 Mestrado de autoria da pós-graduanda em Farmacologia **DANIELE MARIA**  
6 **FERREIRA**, intitulada: "AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE GASTROINTESTINAL E  
7 CICATRIZANTE GÁSTRICA DA RAMNOGALACTURONANA ISOLADA DA  
8 *Acmella oleracea* (L.) R.K. JANSEN EM RATAS", sob orientação da Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cristiane  
9 Hatsuko Baggio e composta pelas professoras: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cristiane Hatsuko Baggio  
10 (Presidente - Farmacologia - UFPR); Alexandra Acco (Farmacologia – UFPR) e Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>  
11 Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Clélia Akiko Hiruma (Laboratório de Produtos Naturais - UNESP). A Banca  
12 Examinadora iniciou os trabalhos. A candidata teve quarenta e cinco minutos para expor  
13 oralmente seu trabalho, sendo em seguida arguida durante trinta minutos por cada um dos  
14 membros da Banca e tendo trinta minutos para responder a cada uma das arguições. No  
15 final a Comissão Examinadora emitiu o seguinte parecer: Aprovada. De  
16 acordo com o Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, a pós-  
17 graduanda foi aprovada. Para a publicação, o trabalho deverá sofrer as modificações  
18 sugeridas, que serão conferidas pela sua orientadora. Nada mais havendo a tratar, a  
19 Presidente deu por encerrada a sessão, da qual foi lavrada a presente ata, que será assinada  
20 pela Presidente e pelos demais Membros da Banca Examinadora em Curitiba, 22 de  
21 fevereiro de 2013.

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cristiane Hatsuko Baggio (Presidente - Farmacologia - UFPR)

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Alexandra Acco (Farmacologia – UFPR)

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Clélia Akiko Hiruma (Laboratório de Produtos Naturais - UNESP)



*“And while I can think, while I can talk,  
while I can stand, while I can walk,  
while I can dream, please let my dream come true!”*

(Elvis A. Presley)

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	iv
LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
RESUMO.....	xi
ABSTRACT .....	xii
1. INTRODUÇÃO .....	15
1.1Úlcera gástrica .....	15
1.4.1 Descrição botânica.....	28
1.4.2 Atividades biológicas .....	29
1.4.3 Composição química.....	31
1.5 Ramnogalacturonana .....	32
2. OBJETIVOS .....	34
2.1 Objetivo geral.....	34
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	36
3.1 Material botânico.....	36
3.2 Isolamento da ramnogalacturonana .....	36
3.3 Animais.....	37
3.4 Lesões gástricas induzidas por etanol.....	38
3.5 Quantificação dos níveis de muco gástrico.....	38
3.6 Avaliação da secreção ácida gástrica .....	39
3.7 Úlcera gástrica induzida por ácido acético .....	39
3.8 Análise histológica .....	40
3.9 Avaliação da proliferação celular .....	40

3.10 Avaliação dos níveis de mucina .....	41
3.11 Preparação das frações subcelulares do estômago .....	42
3.12 Dosagem de proteínas.....	42
3.13 Quantificação dos níveis da glutathione reduzida (GSH).....	42
3.14 Quantificação dos níveis de lipoperóxidos (LOOH).....	43
3.15 Determinação da atividade enzimática da glutathione S-transferase (GST)	43
3.16 Determinação da atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD)....	44
3.17 Avaliação <i>in vitro</i> do sequestro do radical livre DPPH .....	44
3.18 Determinação dos níveis da mieloperoxidase (MPO).....	45
3.19 Determinação da atividade enzimática da N-acetilglucosamidase (NAG) .	45
3.20 Determinação dos níveis de citocinas.....	46
3.21 Avaliação Toxicológica.....	46
3.22 Análise Estatística.....	46
4. RESULTADOS .....	48
4.1 Efeito do RGal sobre as lesões gástricas induzidas por etanol.....	48
4.2 Efeito do RGal sobre os níveis de muco e GSH gástricos após a lesão induzida por etanol.....	49
4.3 Efeito do RGal na secreção ácida gástrica basal .....	52
4.4 Efeito do RGal sobre a úlcera gástrica crônica induzida por ácido acético..	54
4.5 Efeito do RGal sobre a proliferação celular após a indução de úlcera gástrica crônica por ácido acético.....	56
4.6 Efeito do RGal sobre os níveis de mucina após a indução de úlcera gástrica crônica por ácido acético.....	56
4.7 Efeito do RGal sobre os níveis de GSH e LOOH após a indução de úlcera gástrica crônica por ácido acético .....	59

<b>4.8 Efeito do RGal sobre a atividade enzimática da SOD e GST após a indução de úlcera gástrica crônica por ácido acético .....</b>	<b>61</b>
<b>4.9 Efeito do RGal sobre o sequestro do radical DPPH <i>in vitro</i> .....</b>	<b>62</b>
<b>4.10 Efeito do RGal sobre os níveis das enzimas MPO e NAG após a indução de úlcera gástrica crônica por ácido acético .....</b>	<b>63</b>
<b>4.11 Efeito do RGal sobre os níveis de TNF-<math>\alpha</math>, IL-1<math>\beta</math> e IL-10 .....</b>	<b>66</b>
<b>4.12 Efeito do tratamento de 7 dias com o RGal sobre parâmetros toxicológicos .....</b>	<b>69</b>
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>72</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>86</b>
<b>7. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>88</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Barreira muco-bicarbonato do estômago .....	16
<b>Figura 2.</b> Cicatrização da úlcera gástrica: re-epitelização, reconstrução glandular e angiogênese.....	22
<b>Figura 3.</b> Ilustração da <i>Acmella oleracea</i> .....	28
<b>Figura 4.</b> Estrutura química da ramnogalacturana isolada da <i>A. oleracea</i> .....	37
<b>Figura 5.</b> Efeito do RGal administrada oralmente (Painel A) ou intraperitonealmente (Painel B) sobre as lesões agudas induzidas por etanol P.A. em ratas.....	49
<b>Figura 6.</b> Efeito do RGal administrada oralmente (Painel A) ou intraperitonealmente (Painel B) sobre os níveis de muco da mucosa gástrica após as lesões agudas induzidas por etanol P.A. em ratas.....	50
<b>Figura 7.</b> Efeito do RGal administrada oralmente (Painel A) ou intraperitonealmente (Painel B) sobre os níveis de GSH da mucosa gástrica após as lesões agudas induzidas por etanol P.A. em ratas.....	51
<b>Figura 8.</b> Efeito do RGal administrada intraduodenalmente (Painéis A e B) ou oralmente (Painéis C e D) sobre o volume e a acidez total da secreção ácida gástrica em ratas submetidas a ligadura do piloro.....	53

<b>Figura 9.</b> Efeito do RGal sobre a úlcera gástrica crônica induzida por ácido acético 80% em ratas.....	54
<b>Figura 10.</b> Análise macroscópica (Painéis A, B e C) e histológica (Painéis D, E e F) das úlceras gástricas crônicas induzidas por ácido acético 80% em ratas.....	55
<b>Figura 11.</b> Imunorreatividade para PCNA (antígeno nuclear de proliferação celular) em cortes histológicos de úlceras gástricas crônicas induzidas por ácido acético 80% em ratas.....	57
<b>Figura 12.</b> Avaliação dos níveis de mucina pelo método de coloração PAS de úlceras gástricas crônicas induzidas por ácido acético 80% em ratas.....	58
<b>Figura 13.</b> Efeito do RGal sobre os níveis de GSH (Painel A) e de LOOH (Painel B) da mucosa gástrica após a indução de úlcera gástrica crônica por ácido acético 80% em ratas.....	60
<b>Figura 14.</b> Efeito do RGal sobre a atividade enzimática da SOD (Painel A) e da GST (Painel B) da mucosa gástrica após a indução de úlcera gástrica crônica por ácido acético 80% em ratas.....	62
<b>Figura 15.</b> Efeito do RGal sobre o sequestro do radical DPPH <i>in vitro</i> .....	63

<b>Figura 16.</b> Efeito do RGal sobre os níveis da MPO da mucosa gástrica após a indução de úlcera gástrica crônica por ácido acético 80% em ratas.....	64
<b>Figura 17.</b> Efeito do RGal sobre a atividade da MPO <i>in vitro</i> após a indução de úlcera gástrica crônica por ácido acético 80% em ratas.....	65
<b>Figura 18.</b> Efeito do RGal sobre os níveis da NAG da mucosa gástrica após a indução de úlcera gástrica crônica por ácido acético 80% em ratas.....	66
<b>Figura 19.</b> Efeitos do RGal sobre os níveis de TNF- $\alpha$ (Painel A), IL-1 $\beta$ (Painel B) e IL-10 (Painel C).....	68
<b>Figura 20.</b> Efeito da administração oral do RGal no peso corporal dos animais na úlcera gástrica induzida por ácido acético 80% em ratas após 7 dias de tratamento.....	69



## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Efeito da administração oral do RGal na análise imunohistoquímica para PCNA e análise histológica da coloração de PAS para mucina na úlcera gástrica induzida por ácido acético 80% em ratas.....59

**Tabela 2.** Efeito da administração oral do RGal no peso relativo dos órgãos na úlcera gástrica induzida por ácido acético 80% em ratas.....70

**Tabela 3.** Efeito da administração oral do RGal nos parâmetros bioquímicos analisados: AST, ALT, creatinina ou uréia após úlcera gástrica induzida por ácido acético 80% em ratas.....71

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

**ACh – Acetilcolina**

**AINES – Antiinflamatórios não esteroidais**

**Al(OH)<sub>3</sub> - Hidróxido de alumínio**

**ALT - Alanina aminotransferase**

**AMPc - Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico**

**AST - Aspartato aminotransferase**

**ATP - Adenosina trifosfato**

**CAMs - Moléculas de adesão**

**CaCO<sub>3</sub> - Carbonato de cálcio**

**CAT – Catalase**

**CCK - Receptores de gastrina/colecistocinina**

**CDNB - Dicloro-nitro-benzeno**

**Cl<sup>-</sup> - Íon cloreto**

**COX – Cicloxygenase**

**DPPH - 2,2-difenil-1-picrilhidrazil**

**DTNB - ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzóico)**

**ECL - Células do tipo enterocromafins**

**EGF - Fator de crescimento epidermal**

**ERN - Espécies reativas de nitrogênio**

**ERO - Espécies reativas de oxigênio**

**EtOH – Etanol**

**FeSO<sub>4</sub> – Sulfato Ferroso**

**GPx - Glutathione peroxidase**

**GR - Glutathione redutase**

**GRP - Peptídeo liberador de gastrina**

**GSH - Glutathione reduzida**

**GST - Glutathione S-transferase**

**GSSG – Glutathione na forma oxidada**

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - Peróxido de hidrogênio**

**H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> - Ácido sulfúrico**

**HCl - Ácido clorídrico**

**HOCl - Ácido hipocloroso**

**HTAB - Hexadeciltrimetilamônio**

**IL-1 $\beta$  – Interleucina 1 $\beta$**

**IL-6 – Interleucina 6**

**IL-10 – Interleucina 10**

**IBP – Inibidores da bomba de prótons**

**IP3 - Inositol trifosfato**

**5-LPO - Enzima 5-lipoxigenase**

**LOOH - Hidroperóxidos lipídicos**

**LTB<sub>4</sub> – Leucotrieno B<sub>4</sub>**

**MCP - Proteína quimiotática de monócitos**

**Mg(OH)<sub>2</sub> - Hidróxido de magnésio**

**MPO – Mieloperoxidase**

**N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> - Trióxido de nitrogênio**

**NADPH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase**

**NaH<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> - Bicarbonato de sódio**

**NaOH – Hidróxido de sódio**

**NO - Óxido nítrico**

**O<sub>2</sub>•<sup>-</sup> - Ânion superóxido**

**•OH - Radical hidroxil**

**ONOO<sup>-</sup> - Peroxinitrito**

**PACAP - Peptídeo ativador de adenilato-ciclase pituitária**

**PCNA – Antígeno nuclear de proliferação celular**

**PAF - Fator de ativação plaquetária**

**PG – Prostaglandina**

**PGE<sub>2</sub> – Prostaglandina E2**

**PGI – Prostaciclina**

**PLM - Polimorfonucleares**

**PYY - Peptídeo YY**

**RMN - Ressonância magnética nuclear**

**RGal – Polissacarídeo isolado da *Acmella oleracea***

**RL - Radicais livres**

**SST - Somatostatina**

**SOD - Superóxido dismutase**

**TMB – Tetrametilbenzamida**

**TGF- $\alpha$  - Fator de crescimento-alfa**

**TNF- $\alpha$  – Fator de necrose tumoral-alfa**

**VIP - Peptídeo intestinal vasoativo**

## RESUMO

A ramnogalacturonana é um polissacarídeo isolado da *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen, uma planta conhecida como jambú e utilizada na medicina popular para o tratamento de diversos distúrbios. O presente estudo avaliou o efeito gastroprotetor e cicatrizante gástrico da ramnogalacturonana (RGal), verificando os possíveis mecanismos de ação. O tratamento oral dos animais com RGal reduziu a área lesionada induzida por etanol com uma DE<sub>50</sub> de 1,5 mg/kg. Além disso, RGal administrado por via intraperitoneal também diminuiu a área lesionada, evitando a depleção de muco gástrico. Ainda, no modelo de úlcera crônica induzida por ácido acético 80%, o tratamento oral dos animais com RGal acelerou a cicatrização da úlcera, sendo esta acompanhada pelo aumento da proliferação celular e do conteúdo de mucina gástrico. O RGal também diminuiu os níveis da mieloperoxidase (MPO) e do fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), restaurou os níveis de hidroperóxidos lipídicos (LOOH) e de glutathiona reduzida (GSH), e a atividade das enzimas glutathiona *S*-transferase (GST) e superóxido dismutase (SOD) para os níveis basais. Além disso, RGal também sequestrou o radical 2,2-diphenil-1-picrilhidrazil (DPPH) *in vitro* com CI<sub>50</sub> de 126,9  $\mu$ g/ml. Ainda, o tratamento dos animais com RGal durante 7 dias não provocou alterações clínicas ou comportamentais e não alterou o peso corporal e dos órgãos selecionados ou parâmetros bioquímicos plasmáticos. Coletivamente, esses resultados mostram que RGal possui atividade gastroprotetora e cicatrizante gástrica em ratas. Esses efeitos parecem estar relacionados com a proliferação celular, a manutenção de muco gástrico, redução do processo inflamatório e modulação das defesas antioxidantes.

**Palavras chaves:** *Acmella oleracea*; polissacarídeo; ramnogalacturonana; gastroprotetor; cicatrizante gástrico.

## ABSTRACT

Rhamnogalacturonan is a polysaccharide isolated from *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen, a plant known as *jambú* and used in the traditional medicine to treat several disturbs. The present study evaluated the gastroprotective and gastric ulcer healing effects of rhamnogalacturonan (RGal), verifying the possible mechanisms of action. Oral treatment of animals with RGal reduced the ethanol-induced acute gastric lesions with ED<sub>50</sub> of 1.5 mg/kg. Besides, intraperitoneal administration of RGal also inhibited the gastric lesions without gastric mucus depletion. Furthermore, in the chronic ulcer model induced by 80% acetic acid, oral treatment of animals with RGal accelerated the gastric ulcer healing with increased cell proliferation and gastric mucin content. RGal also decreased the myeloperoxidase (MPO) and tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) levels, restored the lipid hydroperoxides (LOOH) and reduced glutathione (GSH) contents and superoxide dismutase (SOD) and glutathione *S*-transferase (GST) activities to basal levels. In addition, RGal also scavenged the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free-radical with IC<sub>50</sub> value of 126.9  $\mu$ g/ml *in vitro*. Moreover, the 7 days-treatment of animals with RGal did not cause alterations of clinical or behavioral symptoms and did not alter the body and organs weights or plasmatic biochemical parameters. Collectively, these results showed that RGal possess gastroprotective and gastric ulcer healing activity in rats, with participation of cellular proliferation, gastric mucin maintenance, reduction of inflammatory process and modulation of antioxidant system.

**Keywords:** *Acmella oleracea*; rhamnogalacturonan; gastroprotective; gastric ulcer healing.

## 1. INTRODUÇÃO

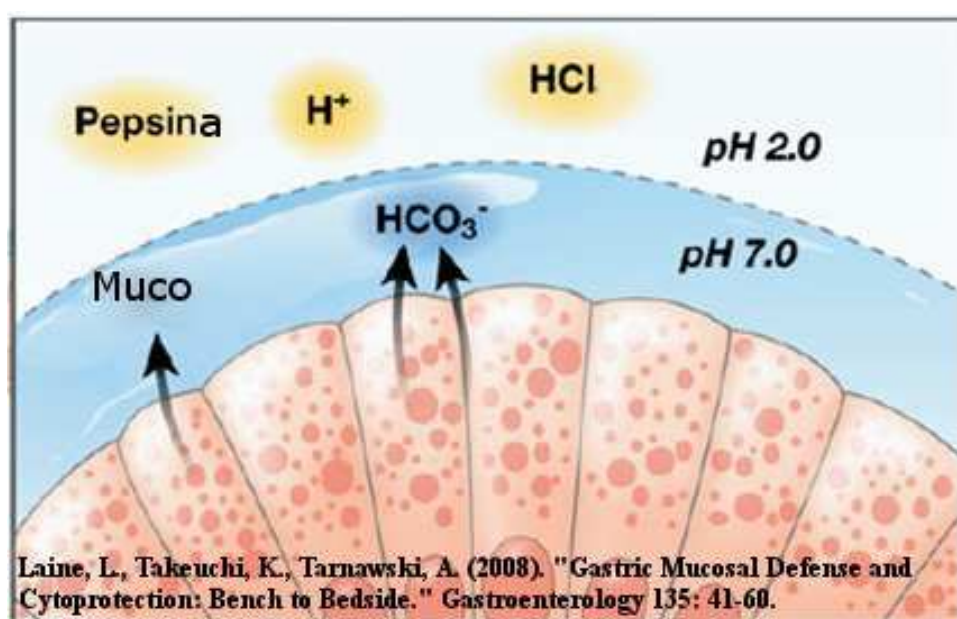
### 1.1 Úlcera gástrica

A úlcera gástrica é uma lesão necrótica profunda que penetra através da mucosa, onde tanto os componentes do tecido epitelial e conectivo, incluindo miofibroblastos subepiteliais, células do músculo liso, vasos e nervos são destruídos (MILANI e CALABRO, 2001; TARNAWSKI e AHLUWALIA 2012). Geralmente, as úlceras resultam de vários e diferentes mecanismos patogênicos, e se formam quando ocorre um desequilíbrio entre os fatores agressores, que podem ser endógenos (ácido clorídrico e pepsina) e também exógenos (antiinflamatórios, etanol, fumo, *Helicobacter pylori*), e os fatores protetores da mucosa gástrica (MALFERTHEINER *et al.*, 2009).

Segundo SZABO (1991), a lesão celular ou tecidual da mucosa gástrica pode ocorrer devido a causas adquiridas ou inatas. As cinco causas principais são: (1) hipóxia e isquemia (devido à diminuição do fluxo sanguíneo ou do decréscimo dos valores de hemoglobina ou ainda por diminuição das enzimas antioxidantes dos tecidos); (2) por agentes químicos (eicosanóides, endotelinas, monoaminas, drogas sintéticas e também substâncias ingeridas propositalmente, como por exemplo, o uso de álcool); (3) por agentes biológicos (bactérias, fungos, parasitas, vírus, o que leva o organismo a desenvolver reações imunológicas para a sua defesa, contudo, essas defesas acabam produzindo radicais livres tóxicos que contribuem para a injúria tecidual); (4) fatores físicos (estresse, força mecânica, temperaturas extremas); e (5) por problemas genéticos. Entretanto, os principais fatores etiológicos que levam ao desenvolvimento de uma úlcera são a infecção por *Helicobacter pylori* e o uso de antiinflamatórios não esteroidais (AINEs) (OKABE *et al.*, 2012).



Apesar da frequente exposição a diversos fatores nocivos, a mucosa gástrica mantém a integridade estrutural e resiste à injúria devido aos mecanismos de defesa, os quais incluem um componente pré-epitelial e o componente epitelial. O fator pré-epitelial é composto pela barreira muco-bicarbonato e constitui a primeira linha de defesa, mantendo um pH neutro ~7,0 na interface luminal da superfície das células epiteliais, enquanto o pH do lúmen é de 1,0-3,0 (TARNAWSKI *et al.*, 2013) (Fig. 1).



**Figura 1.** Barreira muco-bicarbonato do estômago.

O muco é secretado pelas células epiteliais da superfície e contém ~95% de água e ~5% de glicoproteínas, que são denominadas mucinas. As unidades de mucina se polimerizam formando uma cadeia de mucinas essencial para a formação do gel. A secreção de muco é estimulada por hormônios gastrointestinais, incluindo gastrina e secretina, bem como prostaglandina  $E_2$  ( $PGE_2$ ) (LAINE *et al.*, 2008). O muco é capaz de agir como antioxidante e reduzir danos na mucosa promovidos por radicais livres, além de

ter papel importante na cicatrização da úlcera, acelerando a recuperação da mucosa (MAITY *et al.*, 2003). Essa camada de muco retém o bicarbonato secretado pelas células epiteliais da superfície para manter um microambiente neutro (pH ~7,0) e prevenir a digestão proteolítica pela pepsina (LAINE *et al.*, 2008). A função primária da secreção de bicarbonato é neutralizar o ácido difundido através da camada de muco, criando um gradiente de pH próximo da neutralidade na superfície epitelial do estômago (ALLEN e FLEMSTRÖM, 2005). Desta forma, uma pequena quantidade de bicarbonato pode neutralizar uma grande quantidade de ácido, protegendo as células epiteliais (deFONESKA e KAUNITZ, 2010). Assim como no muco, a secreção de bicarbonato também é estimulada pela PGE<sub>2</sub>, além do ácido luminal, fator liberador de corticotrofina (CRF), entre outros (LAINE *et al.*, 2008).

Entretanto, quando essa barreira muco-bicarbonato é destruída, uma série de outros mecanismos protetores entra em ação. A segunda linha de defesa da mucosa é composta pelo componente epitelial que compreende uma camada contínua de células epiteliais da superfície conectadas por junções oclusivas e comunicantes, as quais secretam bicarbonato, muco, prostaglandinas, proteínas de choque térmico (HSP, do inglês *heat shock proteins*) (TARNAWSKI *et al.*, 2013).

As prostaglandinas (PGs) também desempenham papel fundamental na manutenção da integridade da mucosa gástrica. A produção de PGE<sub>2</sub> e PGI<sub>2</sub> é dependente dos níveis de expressão da isoforma do tipo 1 da enzima cicloxigenase (COX-1), que é expressa constitutivamente na maioria dos tecidos. Geralmente as prostaglandinas agem de forma autócrina ou parácrina e têm uma meia vida curta na circulação (segundos a minutos). Estão presentes ao longo de todo o trato gastrointestinal e desempenham um papel importante na modulação da integridade da mucosa e também em várias outras funções, tais

como, inibição da secreção de ácido, estimulação da secreção de muco, bicarbonato e fosfolipídeos, aumentam a resistência das células epiteliais contra danos causados por citotoxinas, além de manter o fluxo sanguíneo, facilitando a remoção de agentes necrotizantes e ulcerogênicos (TAKEUCHI e AMAGASE, 2010). As PGs também inibem a ativação de leucócitos, mastócitos e aderência plaquetária no endotélio vascular. A maior parte das ações protetoras das PGs na mucosa gástrica é mediada por receptores do tipo EP1, o qual aumenta a secreção de bicarbonato e o fluxo sanguíneo e reduz a motilidade gástrica; enquanto EP3 e EP4 afetam a secreção de ácido e muco, respectivamente (LAINE *et al.*, 2008).

Outros mecanismos de defesa incluem a renovação celular contínua do epitélio, que também é responsável pela integridade estrutural da mucosa gástrica e é controlada por fatores de crescimento, tais como o fator de crescimento transformador  $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ) e fator de crescimento insulina-símile 1 (IGF-1), PGs e gastrina (LAINE *et al.*, 2008). Adicionalmente, o fluxo sanguíneo contínuo através dos microvasos é crucial para a manutenção da estrutura e funções da mucosa gástrica e é modulado pelos sistemas nervosos extrínsecos e intrínsecos e por um conjunto de mediadores inflamatórios (MARTIN e WALLACE, 2006). A microcirculação facilita a chegada de oxigênio e nutrientes, além de remover substâncias tóxicas. Ainda, a microcirculação produz potentes vasodilatadores como o óxido nítrico (NO) e prostaciclina ( $\text{PGI}_2$ ), os quais protegem a mucosa e se opõem à ação nociva de vários agentes vasoconstritores como endotelinas, leucotrienos  $\text{C}_4$  e tromboxano  $\text{A}_2$ . Quando a mucosa gástrica é exposta a agentes irritantes (incluindo o ácido clorídrico), ocorre um aumento acentuado e rápido do fluxo sanguíneo

na mucosa, o qual atua para diluir e neutralizam as toxinas, bem como para evitar a acumulação citotóxica das mesmas (TARNAWSKI e AHLUWALIA, 2012).

Mais um componente que possui um papel importante na defesa da mucosa contra fatores exógenos e endógenos é o processo inflamatório. Isto se deve ao fato de que os mediadores inflamatórios podem alterar a integridade da mucosa por influenciar vários componentes dos mecanismos de defesa. Entre esses mediadores inflamatórios estão as PGs, NO, citocinas, entre outros (MARTIN e WALLACE, 2006). Quando ocorre uma lesão superficial da mucosa gástrica, uma resposta inflamatória aguda é acionada. Essa resposta é caracterizada pelo aumento do fluxo sanguíneo, bem como pela extravasamento plasmático e recrutamento dos leucócitos, cujo objetivo é de minimizar a injúria tecidual, facilitar o reparo e prevenir a entrada de substâncias estranhas na circulação sanguínea (WALLACE, 2008).

Finalmente, os sistemas antioxidantes não-enzimático e enzimático representam um importante mecanismo molecular de defesa contra as espécies reativas de oxigênio (ROS) geradas continuamente durante o processo de respiração celular e/ou no processo inflamatório. Apesar das ROS serem capazes de desempenhar papel de defesa (contra organismos patogênicos, por exemplo), elas também têm potencial para danificar ou destruir componentes celulares importantes, como lipídios, proteínas e DNA, quando são produzidas de forma descontrolada (HELLOU *et al.*, 2012). O principal sistema antioxidante não-enzimático endógeno contra o estresse oxidativo é a glutathiona reduzida (GSH). O GSH é um tiol tripeptídeo com diversas funções, sendo o composto sulfidrílico não-protéico mais abundante nas células. Possui papel central como sequestrador de radicais livres e cofator enzimático, na redução de peróxidos pela glutathiona peroxidase (GPx) e na biotransformação e eliminação de xenobióticos pela glutathiona S-transferase

(GST). Em ambas as reações enzimáticas, ocorre a formação de glutathiona oxidada (GSSG), que é reduzida novamente a GSH pela glutathiona redutase (GR) (CNUBBEN *et al.*, 2001; KUMAR DAS e VASUDEVAN, 2007).

Já o sistema enzimático é composto por enzimas antioxidantes que proporcionam a primeira linha de defesa contra as ROS. Entre elas estão a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a GPx (CNUBBEN *et al.*, 2001). A dismutação do ânion superóxido ( $O_2^{\cdot -}$ ) pela SOD resulta na produção de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). O  $H_2O_2$  então é transformado em água e oxigênio ( $O_2$ ) pela ação da CAT, que é outro antioxidante enzimático capaz de desempenhar proteção celular (FUKAI e USHIO-FUKA, 2011). O  $H_2O_2$  também pode ser catalisado em água pela GPx, que se localiza no citosol e na matriz mitocondrial da célula (ORRENIUS *et al.*, 2007). Já a GST também participa da defesa contra o estresse oxidativo devido a sua capacidade em detoxificar compostos endógenos que acarretam danos. A GST é uma superfamília de isoenzimas multifuncionais que catalisam a conjugação de compostos eletrofílicos à GSH (WOUTERS *et al.*, 2011).

Entretanto, quando os componentes protetores da mucosa são insuficientes para limitar a injúria à mucosa gástrica, uma úlcera se desenvolve. A úlcera resulta da necrose tecidual desencadeada pela isquemia, formação de radicais livres e diminuição da oferta de oxigênio e nutrientes. Essa necrose tecidual e a consequente atração de leucócitos e macrófagos, que fagocitam o tecido necrótico e liberam citocinas pró-inflamatórias como o  $TNF-\alpha$ ,  $IL-1\alpha$  e  $IL-1\beta$ , ativam fibroblastos locais e células endoteliais e epiteliais. A úlcera gástrica é caracterizada por uma margem elevada (que é o componente epitelial, formado por tecido adjacente não-necrosado da mucosa), e o tecido de granulação na base da úlcera (que é o componente do tecido conectivo), constituído por fibroblastos e macrófagos, sendo

esse o local em que ocorre a proliferação de novas células endoteliais e formação de microvasos (TARNAWSKI e AHLUWALIA, 2012).

A cicatrização da úlcera é um processo complexo de regeneração tecidual, que envolve proliferação e migração celular, re-epitelização, reconstrução glandular, formação de novos vasos sanguíneos e deposição da matriz (Fig. 2). Todos esses processos são controlados por fatores de crescimento, hormônios, citocinas e fatores de transcrição. Na margem da úlcera, as células epiteliais proliferam e migram para o tecido de granulação para que ocorra a re-epitelização da base da úlcera, um processo essencial para a sua cicatrização (TARNAWSKI *et al.*, 2013). Este processo é importante porque uma barreira de células epiteliais contínua protege o tecido de granulação dos danos mecânicos e químicos ou infecção. Além disso, a migração celular também é dependente do citoesqueleto (filamentos de actina, microtúbulos e suas proteínas associadas), que desempenha um papel importante na estrutura, forma e mobilidade celular (TARNAWSKI e AHLUWALIA, 2012). Já na base da úlcera, o tecido de granulação é responsável por suprir microvasos para a restauração do sistema microvascular e células do tecido conectivo para a restauração da lâmina própria (TARNAWSKI *et al.*, 2013).



**Figura 2.** Cicatrização da úlcera gástrica: re-epitelização, reconstrução glandular e angiogênese.

Entretanto, quando essa cicatrização acontece de forma grosseira anormalidades histológicas e ultraestruturais podem ocorrer, tais como glândulas gástricas dilatadas, tecido conectivo e permeabilidade capilar aumentados, e sistema microvascular desorganizado. Essas anormalidades podem interferir com os mecanismos de defesa da mucosa e causar recorrência da úlcera quando fatores ulcerogênicos estão presentes (TARNAWSKI *et al.*, 2013). Além disso, em alguns casos existe também a infiltração de neutrófilos e macrófagos que podem causar uma inflamação crônica. Esses macrófagos produzem quantidades aumentadas de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ) que irão ativar e estimular outros macrófagos, constituindo um circuito auto-perpetuador; enquanto que os neutrófilos liberam proteases e ROS, que danificam o tecido cicatricial e induzem à recorrência da úlcera (ARAKAWA *et al.*, 2012).



## 1.2 Epidemiologia e tratamento

A doença da úlcera péptica abrange tanto as úlceras gástricas quanto as duodenais e tem sido uma grande ameaça para a população do mundo, com alta morbidade e mortalidade (MALFERTHEINER *et al.*, 2009). A úlcera péptica tende a ser remittente, crônica, e com pouca correlação entre sintomas e presença da úlcera, dificultando a documentação da sua incidência e prevalência (NAJM, 2011). Sabe-se que a úlcera afeta 10% da população mundial (UYANIKOGLU *et al.*, 2010), e anualmente aproximadamente 500.000 pessoas desenvolvem úlcera gástrica nos Estados Unidos, gerando custos diretos e indiretos estimados em 10 bilhões de dólares, e é muito provável que as complicações relacionadas com a doença contribuam para estes custos. Em 70% dos pacientes a úlcera ocorre entre os 25 e 60 anos de idade, muito embora possa ocorrer em qualquer idade (RAMAKRISHNAN *et al.*, 2007).

O sintoma predominante da úlcera péptica é a dor epigástrica, a qual pode ser acompanhada por outros sintomas dispépticos como inchaço, saciedade precoce e náuseas. Entretanto, as úlceras crônicas podem ser assintomáticas; em particular, esta ausência de sintomas é observada nas úlceras induzidas por anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs), onde o sangramento ou perfuração é a primeira manifestação clínica da doença (MALFERTHEINER *et al.*, 2009).

Por muito tempo a úlcera foi controlada de maneira cirúrgica, o que resultava em altas taxas de morbidade e mortalidade. O desenvolvimento das drogas ao longo dos anos indica uma mudança gradual no foco de tratamento da úlcera péptica. A supressão farmacológica eficaz da secreção de ácido iniciou em meados da década de 70, com a

introdução dos antagonistas de receptores histaminérgicos H<sub>2</sub>: cimetidina, em 1976, e a ranitidina em 1982. Até 1990 foram os fármacos mais prescritos no mundo inteiro sendo usados para a supressão ácida por mais de 25 anos, diminuindo em até 85% a necessidade de cirurgia (YUAN *et al.*, 2006; JAIN *et al.*, 2007).

Mais tarde, os antagonistas dos receptores H<sub>2</sub> foram gradualmente substituídos por uma classe de drogas inibidoras de ácido mais potente, os inibidores da bomba de prótons (IBPs), tais como omeprazol, lansoprazol, pantoprazol e esomeprazol. Os IBPs são medicamentos que bloqueiam seletivamente a bomba de prótons (H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase) da célula parietal e se tornaram os medicamentos de escolha para o tratamento da úlcera. Um segundo grupo de drogas é direcionado para o reforço da barreira mucosa, entre eles estão o misoprostol (análogo da PG), sucralfato e sais de bismuto, que também promovem a cicatrização da úlcera (MALFERTHEINER *et al.*, 2009). Quando a *Helicobacter pylori* está presente, o tratamento enfoca a sua erradicação com o uso dessas drogas combinadas com antibióticos (NAJM, 2011).

Entretanto, apesar da grande efetividade apresentada pelos antagonistas dos receptores H<sub>2</sub> e IBPs, esses medicamentos podem apresentar alguns inconvenientes quando utilizados por longos períodos devido à intensa supressão do ácido. Dentre esses efeitos, podemos citar a osteoporose, riscos aumentados de infecções entéricas, metabolismo alterado de outros medicamentos, e desenvolvimento de pólipos gástricos que podem evoluir para câncer gástrico (CHUBINEH e BIRK, 2012).

Tendo em vista os efeitos colaterais provocados pela utilização prolongada desses fármacos, se torna de extrema importância a contínua investigação de novas alternativas para o desenvolvimento de novos fármacos capazes de promover a prevenção e a cicatrização de úlceras, com ausência ou redução de efeitos colaterais, além de tentar evitar

a recorrência da úlcera. Uma alternativa interessante nessa busca por novas terapias seria a utilização de plantas medicinais.

### 1.3 Plantas medicinais e efeitos biológicos

Compostos derivados a partir de fontes naturais como, por exemplo, plantas, animais e microorganismos, são definidos como produtos naturais. Por milhares de anos os produtos naturais têm sido usados como uma das principais fontes de agentes terapêuticos, e sabe-se que a grande maioria dos medicamentos utilizados pelo homem até o início do século XIX, era composta basicamente por produtos oriundos de plantas (BARROS, 2006).

Ao longo do século passado até os dias atuais, as plantas tem sido uma das principais fontes de compostos químicos, contribuindo para a descoberta de novos fármacos. Novos medicamentos derivados de produtos naturais ou sinteticamente modificados foram desenvolvidos para o uso clínico com sucesso (BAKER *et al.*, 2007). Neste sentido, podemos citar a morfina e a codeína isoladas da *Papaver somniferum* L., a digoxina da *Digitalis lanata* Ehrhart, a atropina e hioscina de espécies do gênero Solanaceae, entre inúmeros outros exemplos, os quais ainda hoje são utilizados extensivamente na clínica (CALIXTO, 2000).

Com relação à atividade gastroprotetora, muitas plantas medicinais têm sido estudadas no mundo inteiro. No Brasil, diversos estudos têm demonstrado efeitos antiulcerogênico e cicatrizante gástrico de plantas medicinais em experimentos pré-clínicos. Inclusive, o uso de algumas dessas plantas foram regulamentadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) através da RDC nº. 10 (MS - D.O.U., 2010). Dentre elas estão: a) *Arctium lappa*, que apresentou atividade gastroprotera e acelerou a cicatrização de

úlceras através da inibição da secreção ácida gástrica e do estresse oxidativo (SANTOS *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2013); b) *Baccharis trimera*, que protegeu a mucosa gástrica contra lesões gástricas e inibiu a secreção ácida gástrica (DIAS *et al.*, 2009; BIONDO *et al.*, 2011); e c) *Maytenus ilicifolia*, que apresentou efeito antiulcerogênico e também inibiu a secreção ácida gástrica (SOUZA-FORMIGONI *et al.*, 1991; TABACH e OLIVEIRA, 2003; JORGE *et al.*, 2004; BAGGIO *et al.*, 2007). Esta última também foi incluída na Relação Nacional de Medicamentos Essenciais – RENAME/2012 e é disponibilizada no SUS por meio do Componente Básico da Assistência Farmacêutica através da Portaria MS/GM nº 533 de 2012 (MS – D.O.U., 2012).

Recentemente, a Anvisa aprovou o primeiro fitomedicamento brasileiro (Kios da Hebron®) à base de uma planta brasileira (*Schinus terebinthifolius*), indicado para o tratamento da gastrite. A planta demonstrou evidências científicas em relação à cicatrização da mucosa gastrointestinal, além de atividade anti-inflamatória e antimicrobiana (Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>). Além disso, um grande número de medicamentos feitos de produtos naturais tem sido aprovado nos últimos anos pelo FDA (Food and Drug Administration) (KINGHORN *et al.*, 2011).

É importante ressaltar que as atividades biológicas das plantas medicinais e de seus compostos isolados têm sido reconhecidas e o seu uso para complementar o tratamento das mais diversas doenças incentivado; entretanto, estudos comprovando seus efeitos e descartando sua toxicidade são necessários para obter o benefício esperado sem comprometer ainda mais a saúde do paciente. Neste contexto, o Programa de Pós-graduação do Departamento de Farmacologia do Setor de Ciências Biológicas da UFPR contribui para o uso seguro de plantas medicinais e suas substâncias bioativas, através da

pesquisa científica com metodologias internacionalmente padronizadas, buscando a validação de suas atividades sobre o trato gastrointestinal. Os estudos realizados em nosso laboratório visam demonstrar a eficácia, a segurança e o mecanismo de ação destes produtos naturais.

#### **1.4. *Acmella oleracea***

A *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen (Fig. 3) é uma planta anual ou perene de vida curta, muito comum em toda a região da Amazônia (Norte do Brasil), onde é localmente conhecida como jambú, agrião selvagem ou agrião do Pará. A *A. oleracea* possui como basônimo *Spilanthes oleracea* L. e várias sinonímias botânicas, sendo a mais conhecida *Spilanthes acmella* var. *oleracea* (L.) C.B. Clarke ex Hook. f. (Tropicos.org. Missouri Botanical Garden).

O jambú tem sido usado como tempero em pratos típicos da região, como o tacacá e o pato do tucupi, e também como especiarias pelos chineses. Seus brotos e folhas são usados na medicina popular para o tratamento de várias doenças e também na indústria de cosméticos (CAVALCANTI, 2008).



**Figura 3.** Ilustração da *Acmella oleracea*.

#### 1.4.1 Descrição botânica

A *A. oleracea* é uma angiosperma da família Asteraceae (Compositae) que compreende cerca de 200 gêneros e 1900 espécies só no Brasil (JOLY, 1993). O gênero *Acmella* é largamente distribuído em regiões tropicais e subtropicais (HATTORI e NAKAJIMA, 2008).

Trata-se de uma planta semi-ereta e de ramos decumbentes e caule cilíndrico, atingindo cerca de 40 cm de altura (COUTINHO *et al.*, 2006). A raiz é axial com muitas ramificações, a haste é do tipo rastejante ramificada em dicásio, podendo ocorrer em tricásio (SAWAKI, 2000). Apresenta folhas simples, opostas, longo-pecioladas, com lâminas ovadas de 53 a 106 mm de comprimento e 40 a 79 mm de largura, agudas,

membranosas. Suas flores são pequenas e isoladas, medem cerca de 1 cm de diâmetro, verde-claras ou amarelas e dispostas em capítulos globosos terminais ou axiliares com carola curva, pecioladas, pecíolos de 20-60 mm de comprimento, achatados, com sulcos sobre a superfície, ligeiramente alado e pouco piloso. Juntamente com as folhas, apresentam um sabor picante e causam leve formigamento e entorpecimento da língua (COUTINHO *et al.*, 2006; RATNASOORIYA *et al.*, 2004).

A planta desenvolve-se bem em climas quentes e úmidos com boa umidade e drenagem (VILLACHICA *et al.*, 1996), e floresce durante todo o ano nos trópicos e durante o início do verão em regiões temperadas, fornecendo 2 a 3 colheitas por ano (HIND e BIGGS, 2003).

Provavelmente a origem desta espécie seja o Peru e o Brasil, muito embora possa ser cultivada em outras regiões como o oeste da África Tropical (JANSEN, 1985). Porém, segundo Villachica *et al.* (1996), a planta é nativa da Amazônia Oriental.

#### **1.4.2 Atividades biológicas**

O jambú tem sido utilizado na medicina popular para o tratamento de diferentes distúrbios, incluindo dores de dente, estomatite e resfriado. Além disso, o chá das folhas e inflorescências é usado como analgésico e anestésico local por algumas comunidades regionais (TORRES e CHÁVEZ, 2001). Inclusive a inflorescência é muito utilizada como anestésico local em dores de dente devido à sua leve sensação de dormência (VILLACHICA *et al.*, 1996). Estudos etnofarmacológicos feitos com *A. oleracea* também tem relacionado seu uso com o tratamento de asma, dor de garganta, dor de cabeça, febre e reumatismo (SHARMA *et al.*, 2011). A planta inteira também é empregada na elaboração



de infusos que servem para combater anemia, dispepsia, sendo indicado também como antiescorbútico (VILLACHICA *et al.*, 1996).

Diversos estudos têm demonstrado as propriedades biológicas da *A. oleracea* com o intuito de comprovar sua efetividade. Dentre as atividades estudadas podemos citar a anti-inflamatória e analgésica, as quais foram atribuídas ao extrato aquoso da *A. oleracea* devido à presença de flavonóides. O extrato foi capaz de reduzir o edema de pata induzido por carragenina em ratos e inibir as contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos (CHAKRABORTY *et al.*, 2004). Ainda, o mesmo grupo mostrou que o extrato aquoso também apresentou efeito anestésico e antipirético, atribuindo-o à presença de flavonóides e alcaloides (CHAKRABORTY *et al.*, 2010). Além disso, uma alcaloide (espilantol) inibiu a expressão de mediadores pró-inflamatórios em macrófagos ativados por lipopolissacarídeo (LPS) (WU *et al.*, 2008).

Outra atividade que já foi demonstrada para o extrato aquoso das flores é a diurética. Segundo Ratnasooriya *et al.*, 2004, o extrato induziu diurese similar a da furosemida, com leve acidificação na urina e aumento nos níveis de sódio e potássio, sugerindo que o mesmo atua como um diurético de alça, devido à presença de alcalóides. Em outro estudo, o extrato clorofórmico da *A. oleracea* apresentou atividade vasorelaxante dependente de óxido nítrico e prostaciclina (WONGSAWATKUL *et al.*, 2008).

### 1.4.3 Composição química

Todos os seres vivos possuem atividade metabólica, que se define por um conjunto de reações químicas que ocorre no interior das células. Nas plantas, o metabolismo é dividido em primário e secundário. Os metabólitos primários (lipídios, proteínas e carboidratos) são essenciais e estão envolvidos na respiração, assimilação de nutrientes, crescimento e desenvolvimento. Já os metabólitos secundários, como compostos fenólicos, alcalóides, terpenóides, óleos essenciais, entre outros, são compostos formados a partir dos metabólitos primários, de distribuição restrita e que não estão diretamente relacionadas à manutenção da vida da planta (KLIEBENSTEIN, 2004).

A *A. oleracea*, é fonte de ácidos graxos essenciais, principalmente o ácido linoleico, um ácido graxo ômega-6 insaturado presente na composição de ácido graxos dos óleos fixos da planta (PHRUTIVORAPONGKUL *et al.*, 2008). Nos óleos essenciais de caules os principais componentes encontrados foram: 3-trideceno isoeugenol e germacreno-D; nas folhas: germacreno-D, farneseno, 3-trideceno; e nas inflorescências: 3,7-dimetil-1,3,6-octatrieno, espilantol, farneseno (VULPI *et al.*, 2007).

Foram identificadas várias N-alquilamidas, como N-isobutilamida, 2-metilbutilamida e 2-feniletilamida (RAMSEWAK *et al.*, 1999; BOONEN *et al.*, 2010; MBEUNKUI *et al.*, 2011; PANDEY *et al.*, 2011; SHARMA *et al.*, 2011); compostos fenólicos (ácido vanílico, ácido trans-ferúlico e ácido trans-isoferrúlico); cumarina (escopoletina) e triterpenóides (ácido 3-acetilaleuritólico, b-sitostenona, estigmasterol, estigmasterol-3-O-b-D-glucopiranoside e uma mistura de estigmasteril-and b-sitosteril-3-O-b-D-glucopyranosídeos) (PRACHAYASITTIKUL *et al.*, 2009).

Ainda, estudos mostraram que na composição físico-química das folhas frescas da *A. oleracea* (100 g), foram encontrados: 89 g de água, 0,3 g de lipídeos, 1,9 g de proteínas, 7,2 g de carboidratos, 1,6 g de cinzas, 1,3 g de fibras, 162,0 mg de cálcio, 41,0 mg de fósforo, 0,03 mg de vitamina B1, 4,0 mg de ferro, 0,21 mg de vitamina B2, 20,0 mg de Vitamina C e colina (REVILLA, 2001; FAVORETO e GILBERT, 2010).

Recentemente, Nascimento *et al.* (2013) identificou pela primeira vez um polissacarídeo da *A. oleracea* como uma ramnogalacturonana.

### **1.5 Ramnogalacturonana**

Dentre os novos compostos que vêm sendo amplamente estudados como estratégia terapêutica, está um grupo de substâncias bioativas conhecidos como polissacarídeos. Os polissacarídeos são polímeros de média a alta massa molecular, constituídos por monossacarídeos conectados por ligações glicosídicas (FREIMUND *et al.*, 2003). Esses polímeros possuem diversas funções no organismo como: armazenamento de energia (amido e glicogênio), estruturação (celulose, quitina e peptideoglicano), além de atuarem como portadores de informações (indicadores de endereçamento para algumas proteínas e como mediadores para interações específicas entre as células e/ou matriz extracelular) (LEHNINGER *et al.*, 2002).

No caso das plantas medicinais, os polissacarídeos são os principais componentes da parede celular e de suas armações estruturais, e são divididos em pectinas, hemiceluloses e celulose (CARPITA e McCANN, 2000). As pectinas formam um grupo complexo de polissacarídeos que são encontrados na parede celular primária e nas camadas intercelulares de plantas terrestres. O principal constituinte das pectinas é o ácido galacturônico, sendo

que proporções variáveis de outros açúcares também estão presentes, como ramnose, arabinose e galactose (BRANDÃO e ANDRADE, 1999). Já as hemiceluloses são polissacarídeos que ocorrem em íntima associação com a celulose, especialmente em tecidos lignificados (ASPINALL, 1959).

As classes estruturais dos polissacarídeos incluem as homogalacturonanas (HG), xilogalacturonanas (XGA), apiogalacturonanas (AGA), ramnogalacturonanas I (RG-I), e ramnogalacturonana II (RG-II). Sendo que as que predominam nas paredes celulares de gimnospermas e angiospermas são as HG, RG-I e RG-II (O'NEILL *et al.*, 2004). A ramnogalacturonana do tipo I (RG I) é um polissacarídeo péctico cuja cadeia principal é constituída de resíduos alternados de GalpA com resíduos de ramnose [ $\alpha$  (1-4D-ácido galacturônico,  $\alpha$ - (1-2) L – ramnose)] (RIDLEY *et al.*, 2001).

O interesse pelas propriedades farmacológicas e bioquímicas dos polissacarídeos tem crescido bastante, uma vez que entre seus efeitos biológicos destacam-se sua atividade antiviral, antitumoral, imunoestimuladora, anti-inflamatória, anticoagulante, hipoglicêmica e anti-úlceras (SRIVASTAVA e KULSHVESHTHA, 1989; YAMADA, 1994; NERGARD *et al.*, 2005; XIAO *et al.*, 2012). As ramnogalacturonanas por sua vez, também apresentam diversos efeitos biológicos benéficos interessantes, tais como antitussígeno, efeitos do tipo anti-depressivo, antirotavirus e imunomodulador (SUTOVSKÁ *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2010; BAEK *et al.*, 2010; KIYOHAR *et al.*, 2010).

Até o presente momento, não existem estudos em relação aos polissacarídeos isolados da *A. oleracea*. Por este motivo, o objetivo do presente estudo foi investigar o efeito gastroprotetor do polissacarídeo (RGal) isolado a partir da *A. oleracea* em modelos experimentais de úlceras gástricas agudas e crônicas em ratos, e os possíveis mecanismos de ação envolvidos na atividade gastroprotetora deste composto.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Investigar o efeito protetor e cicatrizante gástrico da ramnogalacturonana isolado da *Acmella oleracea*, bem como os possíveis mecanismos de ação envolvidos.

### 2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito gastroprotetor da ramnogalacturonana isolada da *Acmella oleracea* contra lesões agudas induzidas por etanol em ratas;
- Investigar a ação da ramnogalacturonana isolada da *Acmella oleracea* sobre a secreção ácida gástrica basal em ratas;
- Verificar a atividade da ramnogalacturonana isolada da *Acmella oleracea* sobre a quantidade de muco e glutathione reduzida da mucosa gástrica com lesões agudas induzidas por etanol;
- Avaliar a ação cicatrizante da ramnogalacturonana isolada da *Acmella oleracea* contra úlcera gástrica crônica induzida por ácido acético em ratas;
- Investigar o efeito da ramnogalacturonana isolada da *Acmella oleracea* sobre os níveis de mucina e a proliferação celular da mucosa gástrica após a indução de úlcera gástrica crônica por ácido acético;
- Verificar a atividade da ramnogalacturonana isolada da *Acmella oleracea* sobre a migração de neutrófilos e macrófagos através da determinação dos níveis de mieloperoxidase e da N-acetil-glicosidase após a indução de úlcera gástrica crônica por ácido acético;

- Investigar a ação da ramnogalacturonana isolada da *Acmella oleracea* sobre o estresse oxidativo após a indução de úlcera gástrica crônica por ácido acético;
- Avaliar o efeito antioxidante *in vitro* da ramnogalacturonana isolada da *Acmella oleracea* no ensaio do DPPH;
- Verificar a ação tóxica da ramnogalacturonana isolada da *Acmelgla oleracea* após a administração por 7 dias em ratas.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

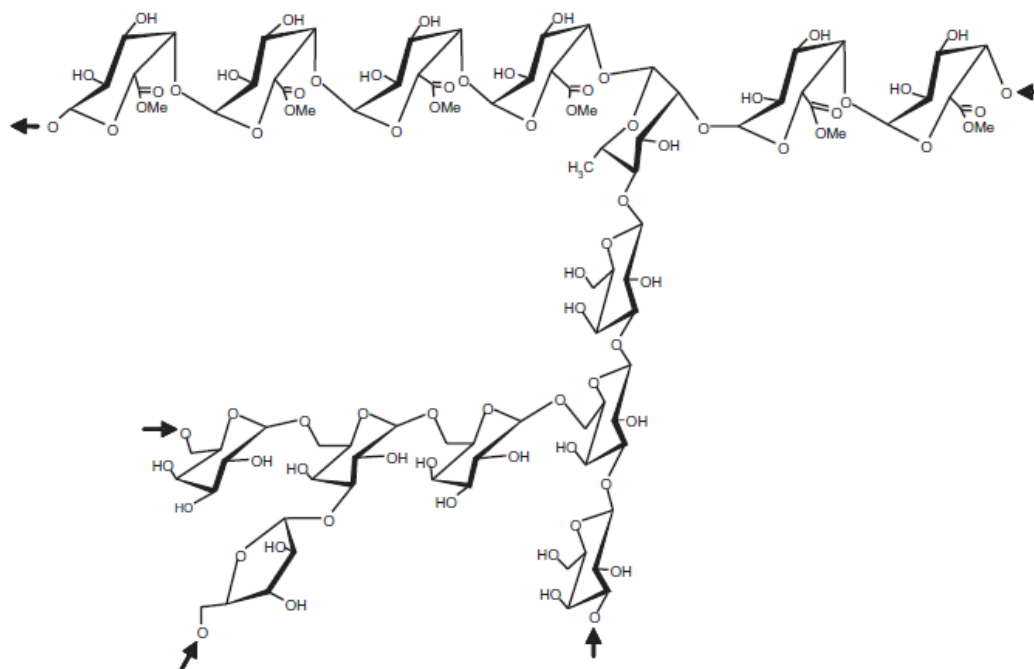
#### 3.1 Material botânico

A planta foi coletada no município de Cruzeiro do Sul, Acre, em agosto de 2010. A identificação botânica foi realizada pela MSc. Rosângela de Araújo Pereira Holanda e Souza do Herbário da Universidade Federal do Acre – Parque Zoobotânico (UFAC-PZ), onde se encontra depositado um exemplar da planta sob registro nº 15099.

#### 3.2 Isolamento da ramnogalacturonana

A ramnogalacturonana (RGal) foi isolada da *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen, purificada e caracterizada pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Thales Ricardo Cipriani do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná.

Resumidamente, folhas de *A. oleracea* foram desengorduradas, despigmentadas e, em seguida, extraídas com água. O extrato aquoso foi tratado com excesso de EtOH para fornecer um precipitado bruto de polissacarídeos. Este último foi submetido ao congelamento-descongelamento até que o precipitado desaparecesse, e a porção solúvel foi tratada com ácido acético, resultando numa fração solúvel (SC) e insolúvel. Análises da composição de SC demonstraram a presença de ácido urônico, galactose, arabinose, ramnose e glicose na proporção molar 15:2:1:1:0.5, com massa molecular ( $M_w$ ) de 226000 g/mol. A estrutura da RGal, com o tipo de ligação da cadeia principal e cadeias laterais, foi confirmada por análise de metilação e ressonância magnética nuclear (RMN), ilustrada na figura 3.



**Figura 4.** Estrutura química da ramnagalacturonana isolada da *A. oleracea*.

### 3.3 Animais

Foram utilizadas ratas Wistar (*Ratus norvegicus*), adultas (180-250 g) e mantidas em condições controladas de temperatura ( $23 \pm 2$  °C) e iluminação (ciclo claro/escuro de 12 horas), tendo livre acesso à água e ração. Os animais foram fornecidos pelo Biotério da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC-PR) e permaneceram em jejum sólido por 15 a 18 h antes da realização dos experimentos. Os protocolos experimentais utilizados estavam de acordo com as normas internacionais e foram aprovados pela Comissão de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Paraná sob o número 473-B.



### 3.4 Lesões gástricas induzidas por etanol

As lesões gástricas agudas induzidas por etanol seguiram a metodologia descrita por Robert *et al.* (1979). Os animais foram tratados com o veículo (água - 1 ml/kg, v.o. ou salina - 1 ml/kg, i.p.), omeprazol (40 mg/kg, v.o.) ou RGal (1, 3, 10 e 30 mg/kg, v.o. ou 0,01, 0,1 e 1 mg/kg, i.p.) e após, 1 h do tratamento oral ou 30 min do tratamento i.p., foi administrado etanol absoluto (P.A.) (0,5 ml/200 g) por via oral. Uma hora após a administração do etanol, os animais foram eutanasiados e os estômagos removidos, abertos pela curvatura menor e estendidos para a análise das lesões gástricas. A avaliação dessas lesões foi realizada através do programa *ImageTool*<sup>®</sup> Versão 3.0, no qual a área total lesionada de cada estômago foi expressa em mm<sup>2</sup>.

### 3.5 Quantificação dos níveis de muco gástrico

O muco foi quantificado usando a porção glandular (corpo) dos estômagos após a indução de lesões gástricas por etanol, de acordo com Corne *et al.*, (1974). O tecido gástrico foi pesado e transferido para uma solução de Alcian Blue 0,1%, preparada em uma solução de sacarose 0,16 mM e acetato de sódio 50 mM (pH 5). Após o período de 2 h em temperatura ambiente, os segmentos foram lavados com duas lavagens sucessivas (15 e 45 min, respectivamente) com solução de sacarose 250 mM e o corante complexado com o muco gástrico foi extraído com solução de cloreto de magnésio 500 mM, agitando-se intermitentemente cada segmento por 1 min a cada 30 min durante 2 h. O material extraído foi então misturado com igual volume de éter dietílico e agitados até a formação de uma emulsão. A emulsão foi centrifugada a 3600 rpm por 10 min e a fase aquosa separada para a leitura da absorbância em 598 nm. O conteúdo de muco foi calculado usando uma curva

padrão de Alcian Blue (6,25-100  $\mu\text{g}$ ), e os resultados foram expressos em  $\mu\text{g}$  de Alcian Blue/g de tecido.

### **3.6 Avaliação da secreção ácida gástrica**

A secreção ácida gástrica foi avaliada após a realização da ligadura do piloro. As ratas foram anestesiadas e, através de uma incisão de cerca de 2 cm no abdômen, o estômago foi localizado para a ligadura do piloro com a utilização de um fio de sutura. Por via intraduodenal, os animais receberam o veículo (água - 1 ml/kg), RGal (10, 30 e 100 mg/kg) ou, por via oral, omeprazol (40 mg/kg). A seguir, a parede abdominal foi suturada e 4 h após a cirurgia, os animais foram eutanasiados e seus estômagos removidos após pinçamento do esôfago. O órgão foi lavado com água, seco e aberto ao longo da curvatura menor. A mucosa foi lavada com 3 ml de água destilada, recolhendo-se o suco gástrico e o conteúdo proveniente da lavagem da mucosa para centrifugação a 1500 rpm por 20 min. Após a centrifugação, o volume gástrico (ml) foi quantificado em proveta e a acidez total ( $\text{mEq}[\text{H}^+]/\text{ml}$ ) por titulação simples com NaOH 0,1 N, utilizando fenolftaleína 2% como indicador ácido-base (DOMER, 1971).

### **3.7 Úlcera gástrica induzida por ácido acético**

A indução da úlcera crônica por ácido acético seguiu a metodologia originalmente proposta por Okabe *et al*, 1971, com algumas modificações. As ratas foram anestesiadas com xilazina e cetamina (10 mg/kg e 5 mg/kg, i.p., respectivamente), tendo a parede abdominal aberta e o estômago exposto. A úlcera foi induzida com a aplicação de 500  $\mu\text{l}$  de ácido acético 80% na serosa da parede gástrica anterior com auxílio de um cilindro de 6

mm de diâmetro. Após 1 min, o ácido acético foi retirado, o local lavado com salina, o estômago recolocado na cavidade abdominal e a parede abdominal suturada. Após a recuperação da anestesia, os animais retornaram ao biotério e permaneceram sob regime de restrição alimentar, com consumo de água livre até o dia seguinte. Então, seguiu-se uma dieta alimentar, na qual a ração foi oferecida duas vezes ao dia por uma hora, durante todo o período do tratamento. Após 2 dias da cirurgia, os animais foram tratados pela via oral com o veículo (água - 1 ml/kg), omeprazol (40 mg/kg) ou RGal (3, 10 e 30 mg/kg), 2 x ao dia durante sete dias. No final do tratamento, os animais foram eutanasiados, seus estômagos removidos e as úlceras medidas em comprimento x altura (mm<sup>2</sup>) com auxílio de uma régua graduada.

### **3.8 Análise histológica**

Após a medição, a úlcera foi fixada em solução de ALFAC (formalina 30%, álcool 80%, ácido acético). As peças foram desidratadas e incluídas em parafina. Após este procedimento, os blocos foram cortados em 5 µm de espessura em micrótomo de maneira semi-seriada. Uma parte das lâminas com os cortes foram submetidas à coloração de hematoxilina e eosina (HE), sendo destinadas a análises de mudanças histopatológicas e da extensão das úlceras (KALLAYA *et al.*, 2006).

### **3.9 Avaliação da proliferação celular**

A análise imunohistoquímica da expressão do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), foi realizada para avaliar os efeitos do RGal sobre a cicatrização da mucosa gástrica após úlcera crônica induzida por ácido acético. Outra parte das lâminas

com os cortes foram desparafinizadas, re-hidratadas e tratadas com  $H_2O_2$  em metanol 3% por 10 min. Em seguida, os cortes foram tratados com tampão fosfato (PBS) com 1% de albumina sérica bovina (BSA) e 0,01% de saponina por 30 min, para redução de marcação não específica e permeabilização celular. Então os cortes foram incubados com anticorpo primário anti-PCNA diluído em PBS/BSA 1% e 0,01% de Triton-X em temperatura ambiente e câmara úmida por 2 h, e, após este tempo, foram lavados com PBS/BSA 1%. Posteriormente, as secções foram incubadas com anticorpo secundário conjugado a peroxidase diluído 1:200 em PBS/BSA 1% em temperatura ambiente e câmara úmida por 1 h. Os sítios de ligação para peroxidase foram detectados por coloração usando cromógeno diaminobenzidina (Kit de substrato DAB), incubando-se por 15 min, e o excesso retirado em água corrente. Dentre todas as etapas, os cortes foram lavados duas a três vezes com PBS. Após, as lâminas foram desidratadas e contra-coradas com hematoxilina. As lâminas foram observadas e fotografadas em scanner (MetaSystems Meta Viewer Version 2.0.100). A quantificação de células com marcação positiva para PCNA foi realizada em três cortes histológicos distintos de cada grupo observando-se três campos diferentes em cada corte. A quantificação foi expressa em número de células marcadas positivamente por foto utilizando o programa ImageJ<sup>®</sup> versão 1.41 (Instituto Nacional de Saúde, EUA) (POTRICH *et al.*, 2010).

### **3.10 Avaliação dos níveis de mucina**

A análise histológica para mucina foi realizada de acordo com Mowry e Winkler (1956), e é utilizada para verificar alterações na mucina (componente do muco gástrico) após a úlcera crônica induzida por ácido acético. As amostras foram desparafinizadas, re-hidratadas, oxidadas em ácido periódico 0,5% por 5 minutos e lavadas em água destilada.

Após, as amostras foram coradas com reativo de Schiff durante 20 min e subsequentemente lavadas com água sulfurosa (três vezes durante 2 min) e em água corrente durante 10 min. Finalmente, as lâminas contendo as amostras foram contra-coradas com hematoxilina durante 20 segundos e desidratadas. As glicoproteínas (mucinas) coradas pelo ácido periódico de Schiff (PAS) foram quantificados com o programa ImageJ<sup>®</sup> (PEREIRA *et al.*, 2012).

### **3.11 Preparação das frações subcelulares do estômago**

As amostras do estômago foram homogeneizadas em tampão fosfato 200 mM (pH 6,5) a 4°C e o homogenato foi usado para determinação da glutathiona reduzida (GSH) e os níveis de lipoperóxidos (LOOH). Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 8900 rpm durante 20 min. O sobrenadante foi coletado para determinação da proteína e atividade das enzimas glutathiona *S*-transferase (GST) e superóxido dismutase (SOD). O pellet foi utilizado para determinação das enzimas mieloperoxidase (MPO) e N-acetil-glicosidase (NAG).

### **3.12 Dosagem de proteínas**

As concentrações de proteína foram determinadas pelo método de Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), utilizando albumina de soro bovino como padrão e realizada de acordo com as instruções do fabricante.

### **3.13 Quantificação dos níveis da glutathiona reduzida (GSH)**

O método para a determinação dos níveis de GSH presentes na mucosa gástrica foi realizado segundo Sedlak & Lindsay (1988). Amostras da mucosa gástrica previamente

submetida ao etanol e da úlcera por ácido acético foram utilizadas para quantificar os níveis de glutathione reduzida (GSH). Em 50 µl deste homogenato foram adicionados 40 µl de ácido tricloracético (ATC) 12%, agitados durante 10 minutos e centrifugados durante 15 minutos a 4500 rpm. Alíquotas de 10 µl foram colocadas em placa de 96 poços e a reação foi iniciada com a adição de 5 µl de DTNB (5,5'-ditiobis 2-ácido nitrobenzóico) (1 mM), 5 min antes da leitura espectrofotométrica (415 nm). Os valores individuais da absorbância foram interpolados em uma curva padrão de GSH (0,375-3 µg) e expressos em µg de GSH/g de tecido.

### **3.14 Quantificação dos níveis de lipoperóxidos (LOOH)**

O homogenato de úlceras por ácido acético foi diluído em metanol 90% (100 µl do homogenato + 10 µl de metanol 90%), pH 6,5, sonificado e centrifugado a 14000 rpm durante 15 min a 4 °C. A quantidade de LOOH foi determinada pelo método de FOX descrito por Jiang *et al.* (1992). O método FOX é baseado na oxidação de  $\text{Fe}^{2+}$  (sulfato de amônio ferroso) em  $\text{Fe}^{3+}$  por hidroperóxido, em meio ácido, na presença de um complexo de pigmentos de Fe (III) de alaranjado de xilenol. Alíquotas da amostra (30 µl) foram incubadas por 30 min em temperatura ambiente com 270 µl do meio reacional contendo 1 ml de alaranjado de xilenol,  $\text{FeSO}_4$  250 µM,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  25 mM e de BHT (Hidroxitolueno butilado) 4 mM em metanol 90%. As leituras foram feitas a 560 nm em espectrofotômetro. Os resultados foram expressos em mmol de hidroperóxido/mg de tecido.

### **3.15 Determinação da atividade enzimática da glutathione S-transferase (GST)**

A determinação da atividade da GST foi realizada com base no método de Habig *et al.*, (1974). A atividade específica da GST foi determinada pela conjugação do dicloro-

nitro-benzeno (CDNB) com GSH, formando um tioéter que pode ser monitorado pelo aumento de absorbância. Assim, 100 µl do sobrenadante foram adicionados a 200 µl de solução-reação contendo CDNB 3 mM (diluído em etanol P.A.) e GSH 3 mM (diluída em tampão fosfato). A atividade da GST foi quantificada em intervalos de 10 s durante 1 min, em espectrofotômetro a 340 nm e expressa em µmoles/mg de proteína/min.

### **3.16 Determinação da atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD)**

A atividade da SOD foi determinada segundo Marklund e Marklund (1974) e baseia-se na capacidade da SOD em inibir a auto-oxidação do pirogalol. As reações foram realizadas em tampão Tris HCl 200 mM com EDTA 2 mM em pH 8,5 e temperatura ambiente. Uma alíquota do sobrenadante (20 µl) foi misturada com tampão Tris-EDTA e agitados em vortex. Após, foram adicionados 25 µl de pirogalol 1 mM e a solução foi incubada por 20 min. Para interromper a reação, 12,5 µl de HCl 1 N foram adicionados, em seguida centrifugados por 4 min a 14000 rpm e o sobrenadante separado para leitura em espectrofotômetro a 405 nm. Os resultados foram expressos em U de SOD/mg de proteína.

### **3.17 Avaliação *in vitro* do sequestro do radical livre DPPH**

A capacidade de redução do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) foi avaliada pela diminuição da absorbância induzida por antioxidantes, de acordo com Blois (1958) e Chen *et al.*, (2004). O sistema de reação era constituído por 750 µl do RGal (concentrações) e 250 µl de solução metanólica de DPPH (concentração). Após 5 min, a diminuição da absorbância foi medida em espectrofotômetro a 517 nm. O ácido ascórbico (50 µg/ml) foi usado como controle positivo e água destilada foi utilizada como controle negativo.

### 3.18 Determinação dos níveis da mieloperoxidase (MPO)

A participação da enzima MPO foi determinada seguindo o método de Bradley *et al.*, (1982) modificado por De Young *et al.*, (1989). O pellet foi ressuspensionado com 1 ml de tampão fosfato de potássio 80 mM na presença de hexadeciltrimetilamônio (HTAB) 0,5%. Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 14000 rpm por 20 min a 4 °C. Em placas de 96 poços foram adicionados 30 µl do sobrenadante, acrescido de 220 µl de uma solução contendo: 100 µl de tampão fosfato de potássio 80 mM, 85 µl de tampão fosfato de potássio 22 mM e 15 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,017%. A reação foi iniciada com a adição de 20 µl de tetrametilbenzidina (TMB) e incubada por 3 min a 37 °C. A reação foi interrompida com 30 µl de acetato de sódio 1,46 M (pH = 3,0) e os níveis enzimáticos foram determinados em espectrofotômetro a 620 nm. Os resultados foram expressos como unidade de densidade óptica (D.O.)/mg de proteína.

### 3.19 Determinação da atividade enzimática da N-acetilglucosamidase (NAG)

A atividade da NAG é baseada na hidrólise do p-nitrofenil-N-acetil-β-D-glucosamina (substrato) pela N-acetil-β-D glucosamidase, liberando p-nitrofenol (Bailey, 1988). Para a análise foram incubados 25 µl do sobrenadante, ou 25 µl de água destilada (branco) com 100 µl de tampão citrato (5 mM, pH 4.5) na presença do substrato (2,24 mM). Após, as placas foram incubadas durante 60 minutos a 37°C e a reação foi interrompida com tampão glicina (200 mM, pH 10,4). Os níveis enzimáticos foram mensurados em espectrofotômetro a 405 nm. Os resultados foram expressos como unidade de densidade óptica (D.O.)/mg de proteína/hora.



### 3.20 Determinação dos níveis de citocinas

Amostras da mucosa gástrica previamente submetidas à úlcera por ácido acético foram utilizadas para quantificar os níveis de citocinas pelo método de ELISA (Mizgerd, Spieker, Doerschuk, 2001). Aliquotas de 100 µl de amostra foram usadas para quantificar os níveis de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-10 através dos kits de ELISA para citocinas (R&D Systems, Minneapolis - USA) de acordo com as instruções do fabricante. A absorbância foi medida usando um leitor de microplacas a 450 nm e 550 nm.

### 3.21 Avaliação Toxicológica

Durante os 7 dias de tratamento com o veículo (água - 1 ml/kg), omeprazol (40 mg/kg) ou RGal (1, 3, 10 e 30 mg/kg), 2 x ao dia, o peso corporal diário dos animais foi registrado e os animais foram observados para detecção de alterações clínicas e comportamentais. No final do experimento, os animais foram eutanasiados e os órgãos selecionados (adrenais, baço, coração, fígado, pulmão, rins, ovários e útero) foram retirados e pesados.

O peso dos órgãos foi apresentado como peso relativo [(peso do órgão/peso do corpo)  $\times$  100]. Amostras de sangue foram coletadas e analisadas usando kit comercial (Bioclin/Quibasa, Belo Horizonte, MG, Brazil). Os parâmetros avaliados foram: alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), creatinina e uréia.

### 3.22 Análise Estatística

Os dados foram representados como a média  $\pm$  erro padrão das médias (n = 6). As diferenças entre as médias foram determinadas através de análise de variância (ANOVA)

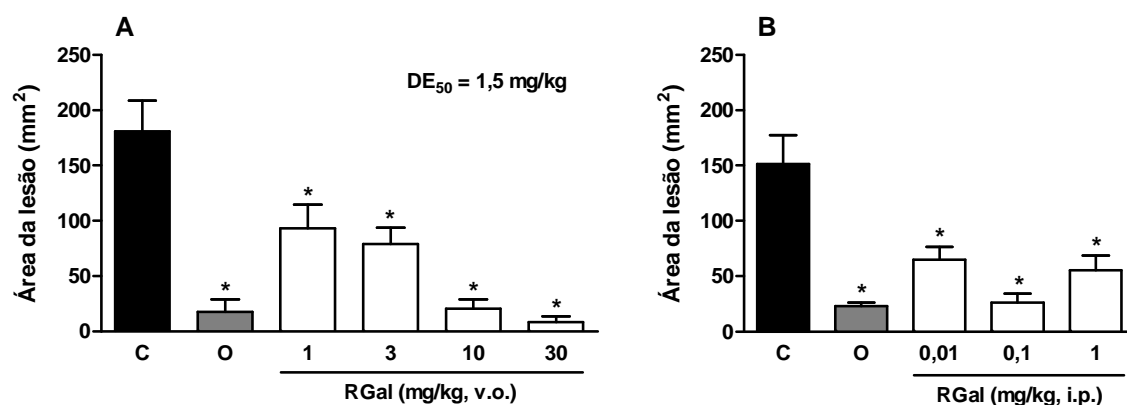
de uma via seguida pelo teste de Bonferroni. As análises foram realizadas usando o programa para *Windows*, *GraphPad Prism* versão 5.0 (*GraphPad Software*, San Diego, EUA). Um valor de  $P$  menor que 0,05 foi considerado significativo.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Efeito do RGal sobre as lesões gástricas induzidas por etanol

A administração oral de etanol absoluto produziu lesões na mucosa gástrica do grupo controle (C:  $181,0 \pm 27,7 \text{ mm}^2$ ). O pré-tratamento dos animais com RGal (1, 3, 10 e 30 mg/kg) reduziu a área lesionada de maneira dose-dependente com uma  $DE_{50}$  de 1,5 mg/kg quando administrado por via oral (Fig. 5A).

De maneira similar, a administração do RGal (0,01, 0,1, e 1 mg/kg) pela via intraperitoneal inibiu a formação de lesões gástricas induzida por etanol em 57, 83 e 65%, respectivamente, quando comparado com o grupo controle (C:  $151,7 \pm 25,7 \text{ mm}^2$ ) (Fig. 5B). O controle positivo do teste, omeprazol (40 mg/kg, v.o.), também promoveu gastroproteção com inibição de 93% quando comparado com o grupo controle.

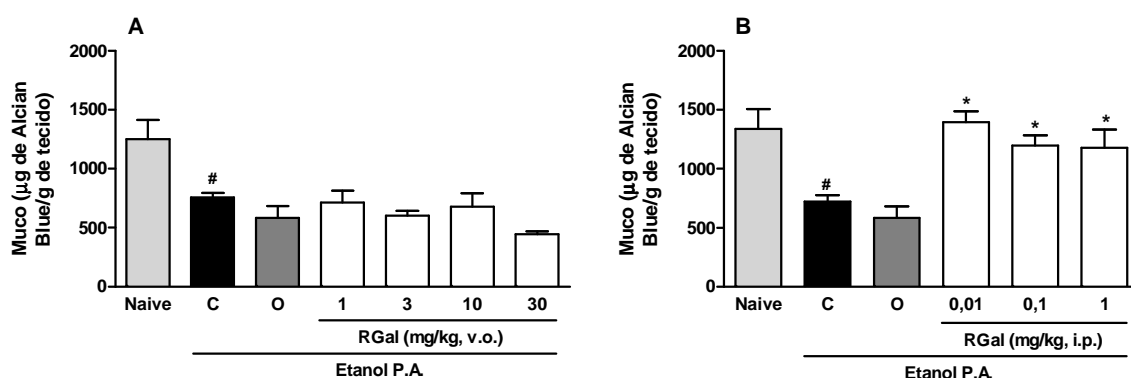


**Figura 5.** Efeito do RGal administrada oralmente (Painel A) ou intraperitonealmente (Painel B) sobre as lesões agudas induzidas por etanol P.A. em ratas. Os animais foram pré-tratados com veículo (C: água - 1 ml/kg, v.o. ou salina - 1 ml/kg, i.p.), omeprazol (O: 40 mg/kg, v.o.) ou RGal (1, 3, 10 e 30 mg/kg, v.o. ou 0,01, 0,1 e 1 mg/kg, i.p.), 60 ou 30 min, respectivamente, antes da administração do etanol. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão das médias ( $n = 6$ ). A comparação entre os grupos foi realizada através da análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de Bonferroni. \* Diferente do grupo controle para  $P < 0,05$ .

#### 4.2 Efeito do RGal sobre os níveis de muco e GSH gástricos após a lesão induzida por etanol

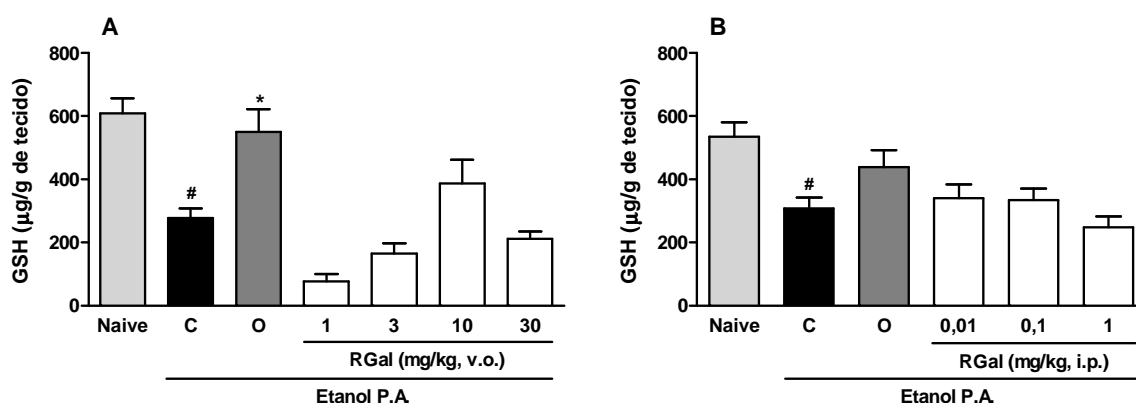
A administração de etanol P.A. diminuiu os níveis de muco em 39% nos animais tratados com veículo quando comparado ao grupo não lesado (Naive:  $1251 \pm 164 \mu\text{g}$  de Alcian Blue/g de tecido) (Fig. 6A). O tratamento oral com RGal (1, 3, 10 e 30 mg/kg) não alterou a quantidade de muco quando comparado com o grupo controle (C:  $758 \pm 40 \mu\text{g}$  de Alcian Blue/g de tecido (Fig. 6A). Interessantemente, a administração intraperitoneal de

RGal (0,01, 0,1 e 1 mg/kg) foi capaz de restabelecer os níveis de muco gástrico para  $1398 \pm 90$ ,  $1197 \pm 89$  e  $1180 \pm 154$   $\mu\text{g}$  de Alcian Blue/g de tecido, respectivamente, comparados com o grupo controle (C:  $725 \pm 51$   $\mu\text{g}$  de Alcian Blue/g de tecido) (Fig. 6B). No entanto, o omeprazol (40 mg/kg, v.o.) não alterou a quantidade de muco quando comparado ao grupo controle (Fig. 6A e B).



**Figura 6.** Efeito do RGal administrada oralmente (Painel A) ou intraperitonealmente (Painel B) sobre os níveis de muco da mucosa gástrica após as lesões agudas induzidas por etanol P.A. em ratas. Os animais foram pré-tratados com veículo (C: água - 1 ml/kg, v.o. ou salina - 1 ml/kg, i.p.), omeprazol (O: 40 mg/kg, v.o.) ou RGal (1, 3, 10 e 30 mg/kg, v.o. ou 0,01, 0,1 e 1 mg/kg, i.p.), 60 ou 30 min, respectivamente, antes da administração do etanol. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão das médias ( $n = 6$ ). A comparação entre os grupos foi realizada através da análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de Bonferroni. <sup>#</sup> Diferente do grupo naive para  $P < 0,05$  e \* Diferente do grupo controle para  $P < 0,05$ .

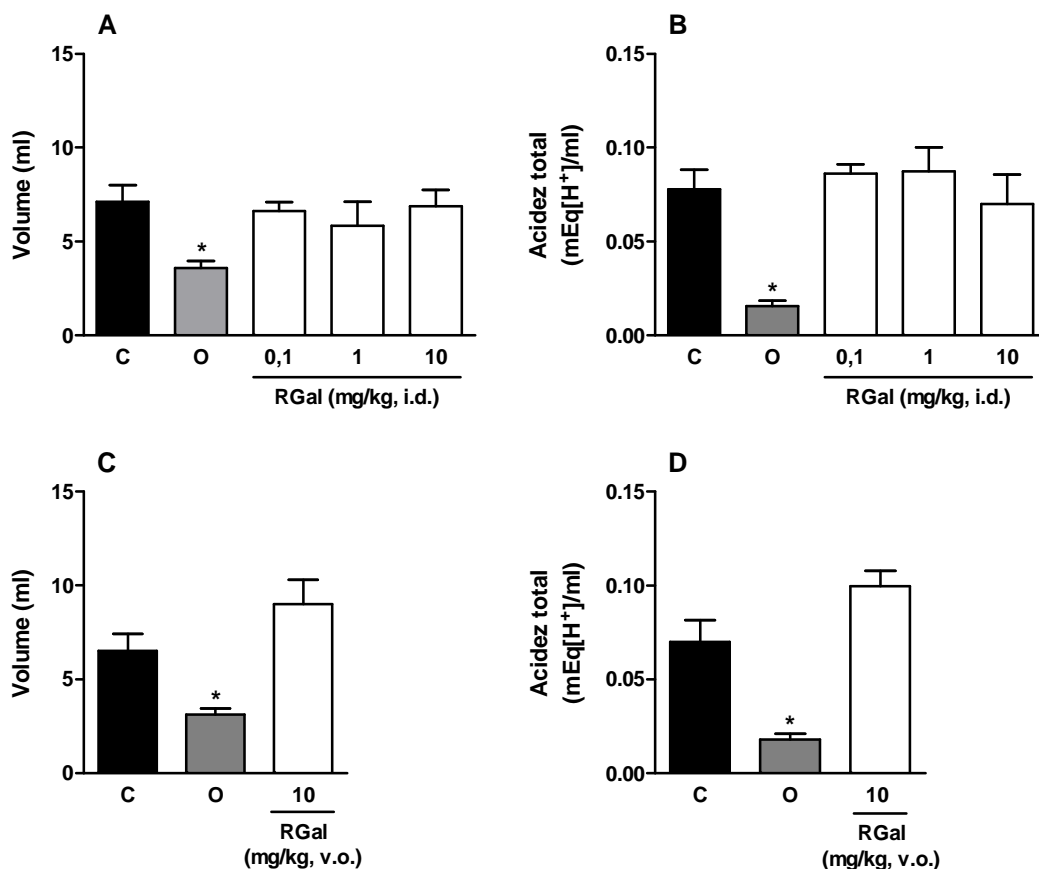
O tratamento dos animais com etanol absoluto depletou os níveis de GSH da mucosa gástrica em até 54% comparado com o grupo que não recebeu etanol (Naive:  $608 \pm 48$   $\mu\text{g}$  de GSH/g de tecido). A administração do RGal, tanto pela via oral quanto pela via intraperitoneal, não conseguiu evitar a depleção do GSH quando comparado ao grupo controle (C:  $277 \pm 31$   $\mu\text{g}$  de GSH/g de tecido) (Fig. 7A e B). O controle positivo do teste, omeprazol (40 mg/kg, v.o.), restabeleceu os níveis de GSH para  $550 \pm 71$   $\mu\text{g}$  de GSH/g de tecido (Fig. 7A).



**Figura 7.** Efeito do RGal administrada oralmente (Painel A) ou intraperitonealmente (Painel B) sobre os níveis de GSH da mucosa gástrica após as lesões agudas induzidas por etanol P.A. em ratas. Os animais foram pré-tratados com veículo (C: água - 1 ml/kg, v.o. ou salina - 1 ml/kg, i.p.), omeprazol (O: 40 mg/kg, v.o.) ou RGal (1, 3, 10 e 30 mg/kg, v.o. ou 0,01, 0,1 e 1 mg/kg, i.p.), 60 ou 30 min, respectivamente, antes da administração do etanol. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão das médias ( $n = 6$ ). A comparação entre os grupos foi realizada através da análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de Bonferroni. # Diferente do grupo naive para  $P < 0,05$  e \* Diferente do grupo controle para  $P < 0,05$ .

### 4.3 Efeito do RGal na secreção ácida gástrica basal

A administração do RGal (0,1, 1 e 10 mg/kg), pela via intraduodenal (i.d.), não alterou o volume e a acidez total da secreção ácida gástrica secretada durante 4 h, quando comparados com o grupo controle (C:  $7,1 \pm 0,9$  ml e  $0,078 \pm 0,010$  mEq[H<sup>+</sup>]/ml, respectivamente) (Fig. 8A e B). De maneira similar, o tratamento oral dos animais com RGal (10 mg/kg) também não foi capaz de alterar o volume e a acidez total do conteúdo gástrico comparado ao grupo controle (C:  $6,5 \pm 0,9$  ml e  $0,070 \pm 0,011$  mEq[H<sup>+</sup>]/ml, respectivamente) (Fig. 8C e D). Entretanto, o controle positivo do teste, omeprazol (40 mg/kg, v.o.), inibiu o volume gástrico em até 52% e a acidez total em até 80% (Fig. 8).

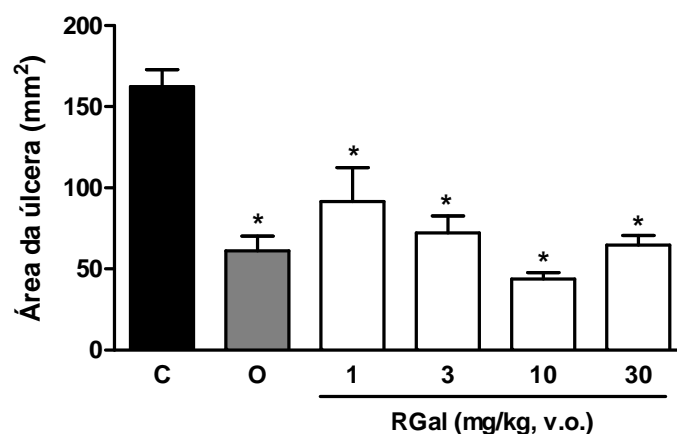


**Figura 8.** Efeito do RGal administrada intraduodenalmente (Painéis A e B) ou oralmente (Painéis C e D) sobre o volume e a acidez total da secreção ácida gástrica em ratas submetidas a ligadura do piloro. Os animais foram tratados com veículo (C: água - 1 ml/kg, i.d. ou v.o.), omeprazol (O: 40 mg/kg, v.o.) ou RGal (0,1, 1 e 10 mg/kg, i.d. ou 10 mg/kg, v.o.), no momento (i.d.) ou 60 min (v.o.) antes da ligadura. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão das médias ( $n = 6$ ). A comparação entre os grupos foi realizada através da análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de Bonferroni. \* Diferente do grupo controle para  $P < 0,05$ .



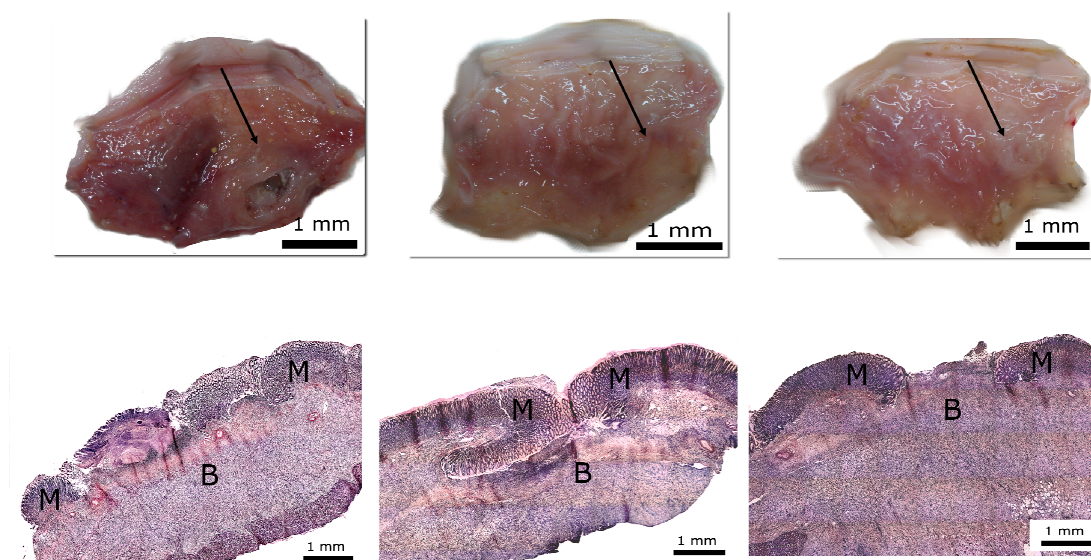
#### 4.4 Efeito do RGal sobre a úlcera gástrica crônica induzida por ácido acético

A administração oral do RGal (1, 3, 10 e 30 mg/kg, duas vezes ao dia, durante sete dias) reduziu a área da úlcera gástrica induzida por ácido acético em 43, 55, 73 e 60% respectivamente, quando comparado ao grupo controle (C:  $162,3 \pm 10,4 \text{ mm}^2$ ). O omeprazol (40 mg/kg, v.o.), controle positivo do teste, também reduziu o tamanho da úlcera em 62% comparado com o grupo controle (Fig. 9).



**Figura 9.** Efeito do RGal sobre a úlcera gástrica crônica induzida por ácido acético 80% em ratas. Os animais foram tratados pela via oral com veículo (C: água - 1 ml/kg), omeprazol (O: 40 mg/kg) ou RGal (1, 3, 10 e 30 mg/kg) durante sete dias a partir do segundo dia após a indução da úlcera. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão das médias ( $n = 6$ ). A comparação entre os grupos foi realizada através da análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de Bonferroni. \* Diferente do grupo controle para  $P < 0,05$ .

As análises macroscópicas do estômago demonstram que o ácido acético promove a formação de uma lesão profunda e extensa, com as margens e base da úlcera bem definidas



(Fig. 10A). No entanto, no tratamento oral dos animais com omeprazol (40 mg/kg) e com RGal (10 mg/kg) houve uma diminuição da área da úlcera quando comparado ao grupo controle (Fig. 10B e C, respectivamente).

**Figura 10.** Análise macroscópica (Painéis A, B e C) e histológica (Painéis D, E e F) das úlceras gástricas crônicas induzidas por ácido acético 80% em ratas. Os animais foram tratados pela via oral com veículo (C: água - 1 ml/kg, Painéis A e D), omeprazol (O: 40 mg/kg, Painéis B e E) ou RGal (10 mg/kg, Painéis C e F) durante sete dias a partir do segundo dia após a indução da úlcera. M: margem da úlcera; B: base da úlcera.

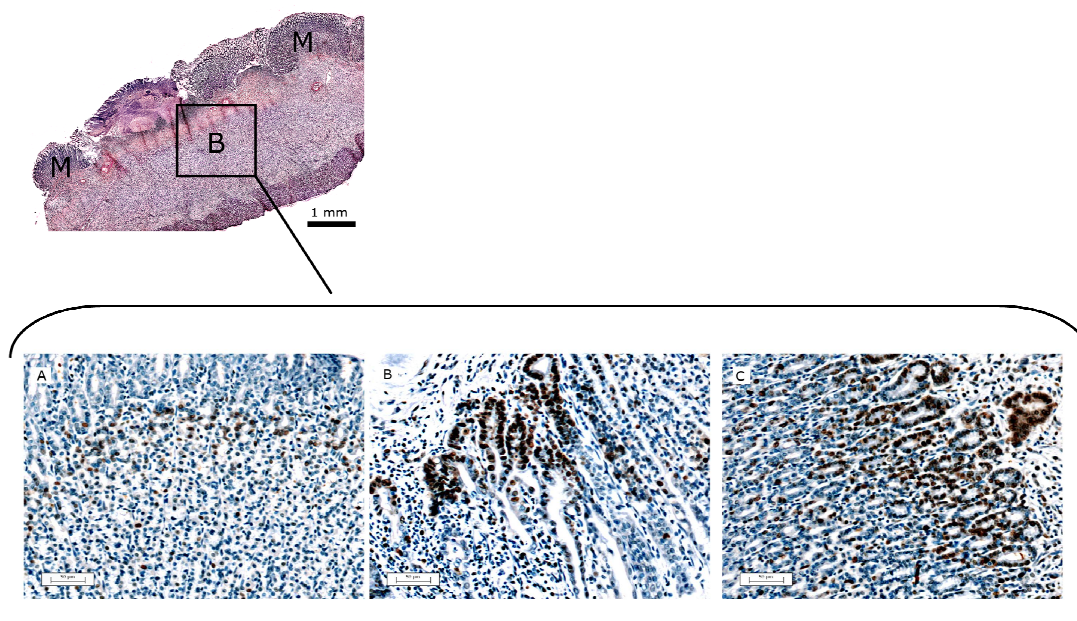
Em conjunto com os dados macroscópicos, a avaliação histológica demonstrou que os animais tratados com omeprazol (40 mg/kg, v.o.) e com RGal (10 mg/kg, v.o.) apresentaram cicatrização parcial da úlcera (Fig. 10E e F) comparado com o grupo tratado apenas com o veículo (Fig. 10D).

#### **4.5 Efeito do RGal sobre a proliferação celular após a indução de úlcera gástrica crônica por ácido acético**

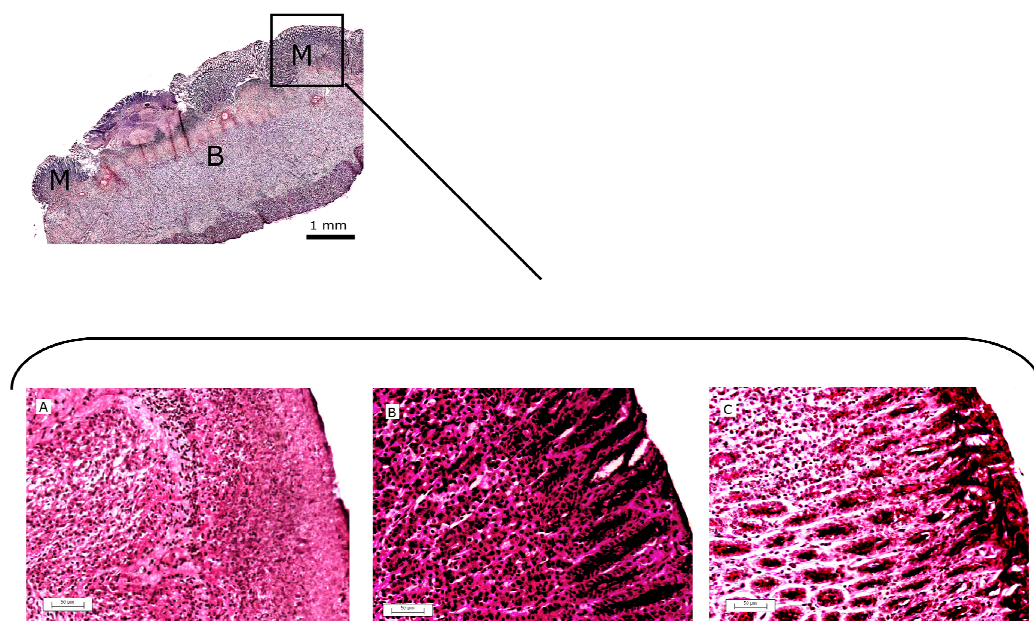
De acordo com a análise histológica, o tratamento dos animais com omeprazol ou RGal (10 mg/kg) mostrou um aumento significativo de imunoreatividade para PCNA na área ulcerada em 121 e 155%, respectivamente (Fig. 11B e C, respectivamente), a qual é caracterizada pela cor marrom e indica as células em proliferação, quando comparado com o grupo controle (C:  $129,3 \pm 31,4$ ) (Fig. 11A e Tabela 1).

#### **4.6 Efeito do RGal sobre os níveis de mucina após a indução de úlcera gástrica crônica por ácido acético**

Os resultados apresentados na Fig. 12A mostram que a aplicação de ácido acético 80% na mucosa gástrica promove a diminuição dos níveis de mucinas (glicoproteínas). Contudo, a administração oral de omeprazol (40 mg/kg) ou RGal (10 mg/kg) aumentaram a coloração para mucina em 65 and 60%, respectivamente (Fig. 12B e C, respectivamente), quando comparado com o grupo controle (C:  $10,55 \pm 0,19$  pixels/campo  $\times 10^4$ ) (Tabela 1).



**Figura 11.** Imunorreatividade para PCNA (antígeno nuclear de proliferação celular) em cortes histológicos de úlceras gástricas crônicas induzidas por ácido acético 80% em ratas. Os animais foram tratados pela via oral com veículo (C: água - 1 ml/kg, Painel A), omeprazol (O: 40 mg/kg, Painel B) ou RGal (10 mg/kg, Painel C) durante sete dias a partir do segundo dia após a indução da úlcera. Imagens representativas da secção de úlceras de 3 animais, observando-se 6 campos diferentes em cada corte (aumento de 100 x, escala = 50 µm).



**Figura 12.** Avaliação dos níveis de mucina pelo método de coloração PAS de úlceras gástricas crônicas induzidas por ácido acético 80% em ratas. Os animais foram tratados pela via oral com veículo (C: água - 1 ml/kg, Painel A), omeprazol (O: 40 mg/kg, Painel B) ou RGal (10 mg/kg, Painel C) durante sete dias a partir do segundo dia após a indução da úlcera. Imagens representativas da secção de úlceras de 3 animais, observando-se 6 campos diferentes em cada corte (aumento de 100 x, escala = 50  $\mu$ m).

**Tabela 1.** Efeito da administração oral do RGal na análise imunohistoquímica para PCNA e análise histológica da coloração de PAS para mucina na úlcera gástrica induzida por ácido acético 80% em ratas.

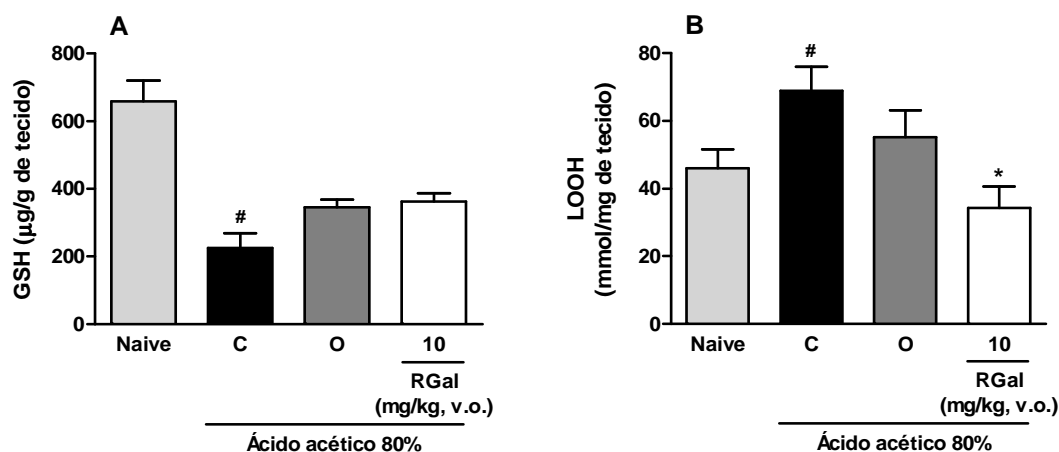
<b>Tratamento</b>	<b>PCNA</b> (número de células em proliferação por campo)	<b>Mucina (PAS)</b> (pixels/campo $\times 10^4$ )
<b>Controle (água, 1 ml/kg)</b>	129,3 $\pm$ 31,4	10,55 $\pm$ 0,19
<b>Omeprazol (40 mg/kg)</b>	285,5 $\pm$ 28,2 *	17,47 $\pm$ 0,24 *
<b>RGal (10 mg/kg)</b>	329,2 $\pm$ 49,3 *	16,94 $\pm$ 0,60 *

Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão das médias (n = 6). A comparação entre os grupos foi realizada através da análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de Bonferroni. \* Diferente do grupo controle para  $P < 0,05$ .

#### **4.7 Efeito do RGal sobre os níveis de GSH e LOOH após a indução de úlcera gástrica crônica por ácido acético**

Na úlcera gástrica crônica, o ácido acético diminuiu os níveis de GSH e aumentou a quantidade de LOOH em 66 e 50%, respectivamente, quando comparado com o grupo não lesionado (N: 658,2  $\pm$  62,3  $\mu$ g de GSH/g de tecido e 46,0  $\pm$  5,7 mmol de LOOH/mg de tecido, respectivamente) (Fig. 13A e B). O tratamento com RGal, na dose de 10mg/kg pela via oral, restaurou os níveis de LOOH para 34,3  $\pm$  6,4 mmol de LOOH/mg de tecido quando comparado com o grupo controle (C: 69,0  $\pm$  7,1 mmol de LOOH/mg de tecido) (Fig. 13B). No entanto, esta mesma dose de RGal não foi capaz de restabelecer a

quantidade de GSH da mucosa gástrica após a aplicação de ácido acético (Fig. 13A). O omeprazol (40 mg/kg, v.o.), controle positivo do teste, também não alterou o conteúdo de GSH e LOOH quando comparados com o grupo controle (Fig. 13A e B).

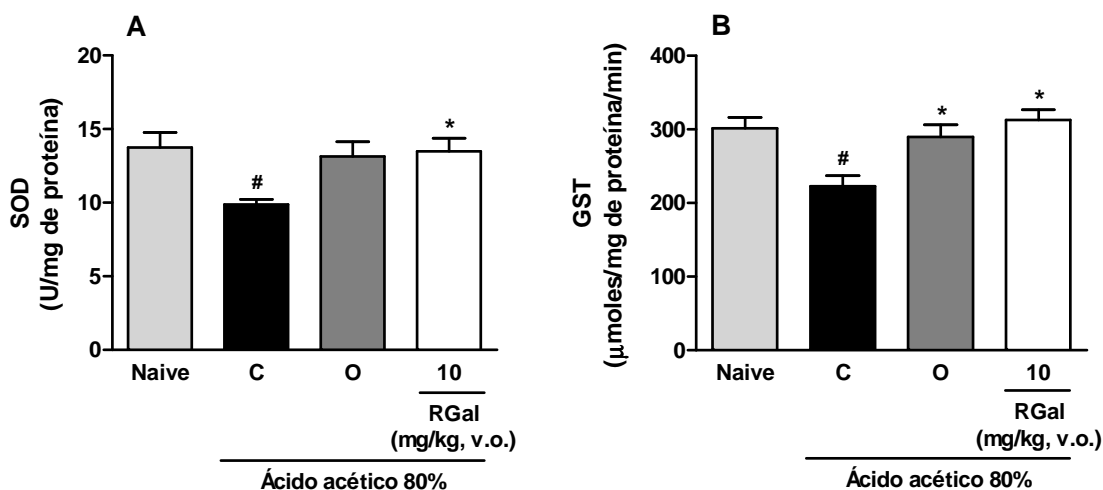


**Figura 13.** Efeito do RGal sobre os níveis de GSH (Painel A) e de LOOH (Painel B) da mucosa gástrica após a indução de úlcera gástrica crônica por ácido acético 80% em ratas. Os animais foram tratados pela via oral com veículo (C: água - 1 ml/kg), omeprazol (O: 40 mg/kg) ou RGal (10 mg/kg) durante sete dias a partir do segundo dia após a indução da úlcera. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão das médias ( $n = 6$ ). A comparação entre os grupos foi realizada através da análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de Bonferroni. <sup>#</sup> Diferente do grupo naive para  $P < 0,05$  e \* Diferente do grupo controle para  $P < 0,05$ .

#### **4.8 Efeito do RGal sobre a atividade enzimática da SOD e GST após a indução de úlcera gástrica crônica por ácido acético**

Após a indução da úlcera com ácido acético, a atividade das enzimas SOD e GST foi diminuída em 28 e 26% quando comparada com o grupo não ulcerado (N:  $13,77 \pm 1,02$  U/mg de proteína e  $301,2 \pm 15,4$   $\mu$ moles/mg de proteína/min, respectivamente) (Fig. 14A e B). Contudo, a administração oral do RGal (10 mg/kg) foi capaz de restaurar a atividade enzimática tanto da SOD quanto da GST para  $13,50 \pm 0,87$  U/mg de proteína e  $312,9 \pm 13,6$   $\mu$ moles/mg de proteína/min, respectivamente, quando comparado com o grupo controle (C:  $9,89 \pm 0,35$  U/mg de proteína e  $222,8 \pm 14,5$   $\mu$ moles/mg de proteína/min) (Fig. 14A e B). O controle positivo do teste, omeprazol (40 mg/kg, v.o.), não alterou a atividade da SOD, mas foi capaz de restaurar a atividade da GST para  $289,7 \pm 16,5$  (Fig. 14A e B).

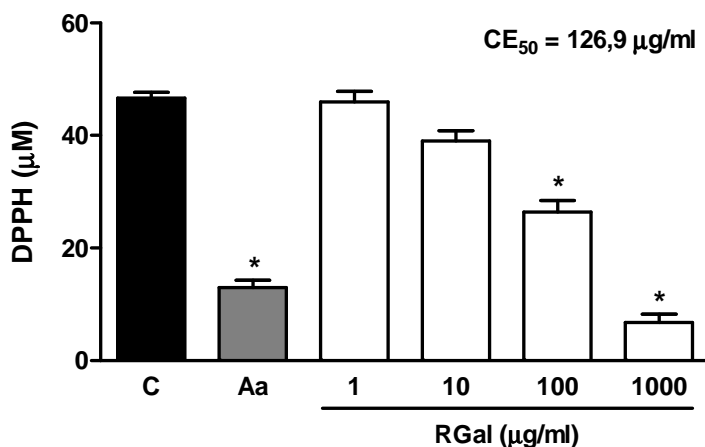




**Figura 14.** Efeito do RGal sobre a atividade enzimática da SOD (Painel A) e da GST (Painel B) da mucosa gástrica após a indução de úlcera gástrica crônica por ácido acético 80% em ratas. Os animais foram tratados pela via oral com veículo (C: água - 1 ml/kg), omeprazol (O: 40 mg/kg) ou RGal (10 mg/kg) durante sete dias a partir do segundo dia após a indução da úlcera. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão das médias ( $n = 6$ ). A comparação entre os grupos foi realizada através da análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de Bonferroni. <sup>#</sup> Diferente do grupo naive para  $P < 0,05$  e <sup>\*</sup> Diferente do grupo controle para  $P < 0,05$ .

#### 4.9 Efeito do RGal sobre o sequestro do radical DPPH *in vitro*

*In vitro*, RGal (1, 10, 100 e 1000  $\mu\text{g/ml}$ ) foi capaz de sequestrar os radicais DPPH de maneira dependente da concentração com  $\text{CE}_{50}$  de 126,9  $\mu\text{g/ml}$ , quando comparado com o grupo controle (C:  $46,7 \pm 1,0 \mu\text{M}$ ) (Fig. 15). O ácido ascórbico (50  $\mu\text{g/ml}$ ) foi usado como o controle positivo do teste e foi capaz de reduzir os níveis de DPPH em 72% (Fig. 15).

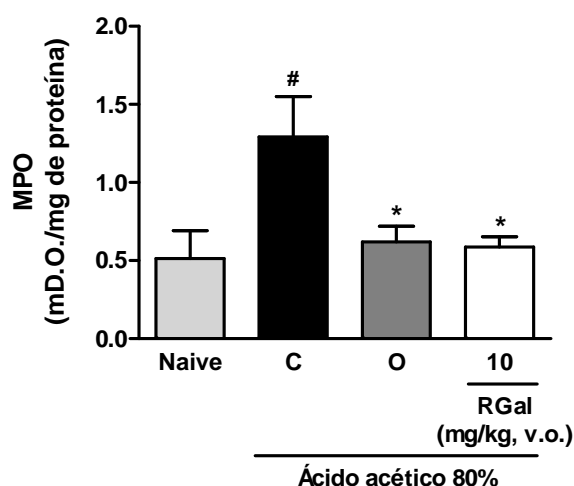


**Figura 15.** Efeito do RGal sobre o sequestro do radical DPPH *in vitro*. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão das médias. A solução contendo DPPH (1, 3, 10, 30, 100, 300, e 1000 μg/ml) foi incubada com ácido ascórbico (Aa: 50 μg/ml) ou RGal (1, 10, 100 e 1000 μg/ml). Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão das médias (n = 4). A comparação entre os grupos foi realizada através da análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de Bonferroni. \* Diferente do grupo controle para  $P < 0,05$ .

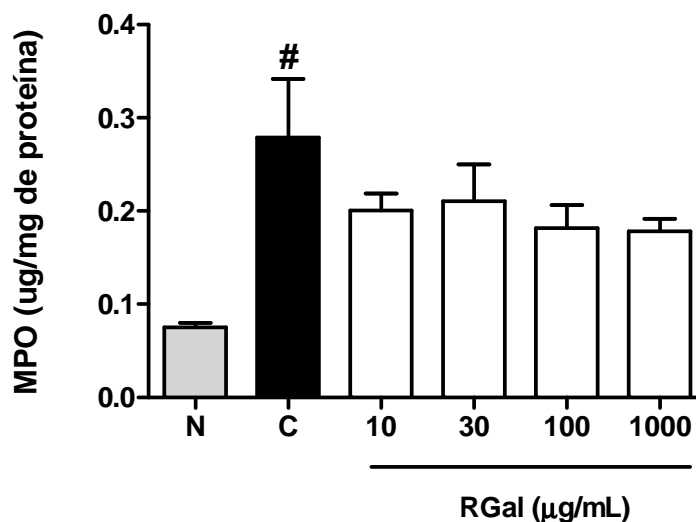
#### 4.10 Efeito do RGal sobre os níveis das enzimas MPO e NAG após a indução de úlcera gástrica crônica por ácido acético

Os valores da MPO foram aumentados em 152% na mucosa gástrica ulcerada quando comparado com os estômagos não ulcerados (N:  $0,51 \pm 0,18$  mO.D./mg de proteína) (Fig. 16). O tratamento oral dos ratos com RGal (10 mg/kg) reduziu significativamente os níveis de MPO em 54% (Fig. 16). Entretanto, quando polissacarídeo foi incubado diretamente com o homogenato (10, 30, 100 e 1000 μg/ml) a atividade da

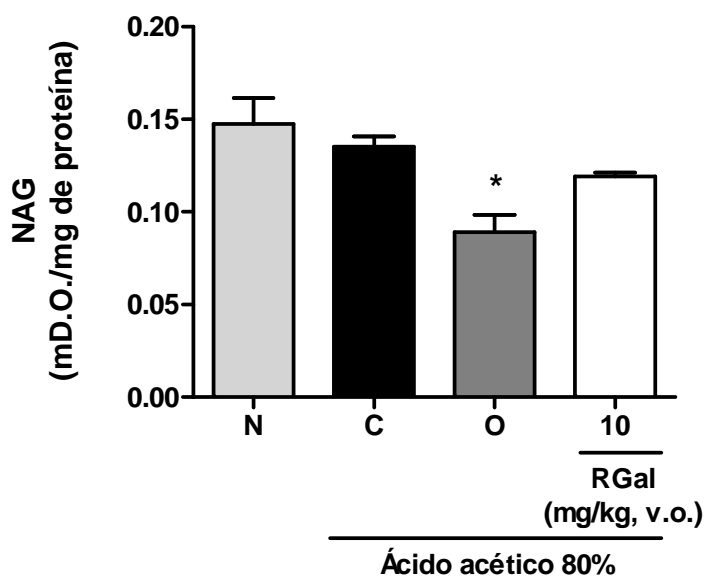
MPO não foi alterada. (Fig. 17). Também não foram observadas diferenças significativas em relação à atividade da NAG após o tratamento com RGal, entretanto, o controle positivo do teste, omeprazol (O: 40 mg/kg), foi capaz de diminuir a atividade desta enzima em relação aos ratos controle (água, 1 ml/kg) (Fig. 18).



**Figura 16.** Efeito do RGal sobre os níveis da MPO da mucosa gástrica após a indução de úlcera gástrica crônica por ácido acético 80% em ratas. Os animais foram tratados pela via oral com veículo (C: água - 1 ml/kg), omeprazol (O: 40 mg/kg) ou RGal (10 mg/kg) durante sete dias a partir do segundo dia após a indução da úlcera. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão das médias ( $n = 6$ ). A comparação entre os grupos foi realizada através da análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de Bonferroni. # Diferente do grupo naive para  $P < 0,05$  e \* Diferente do grupo controle para  $P < 0,05$ .



**Figura 17.** Efeito do RGal sobre a atividade da MPO *in vitro* após a indução de úlcera gástrica crônica por ácido acético 80% em ratas. Os animais foram tratados pela via oral com veículo (C: água - 1 ml/kg), omeprazol (O: 40 mg/kg) ou RGal (10 mg/kg) durante sete dias a partir do segundo dia após a indução da úlcera. Amostras do tecido lesionado foram incubadas com 10, 30, 100 e 1000 µg/ml do polissacarídeo. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão das médias ( $n = 6$ ). A comparação entre os grupos foi realizada através da análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de Bonferroni. <sup>#</sup> Diferente do grupo naïve para  $P < 0,05$  e \* Diferente do grupo controle para  $P < 0,05$ .

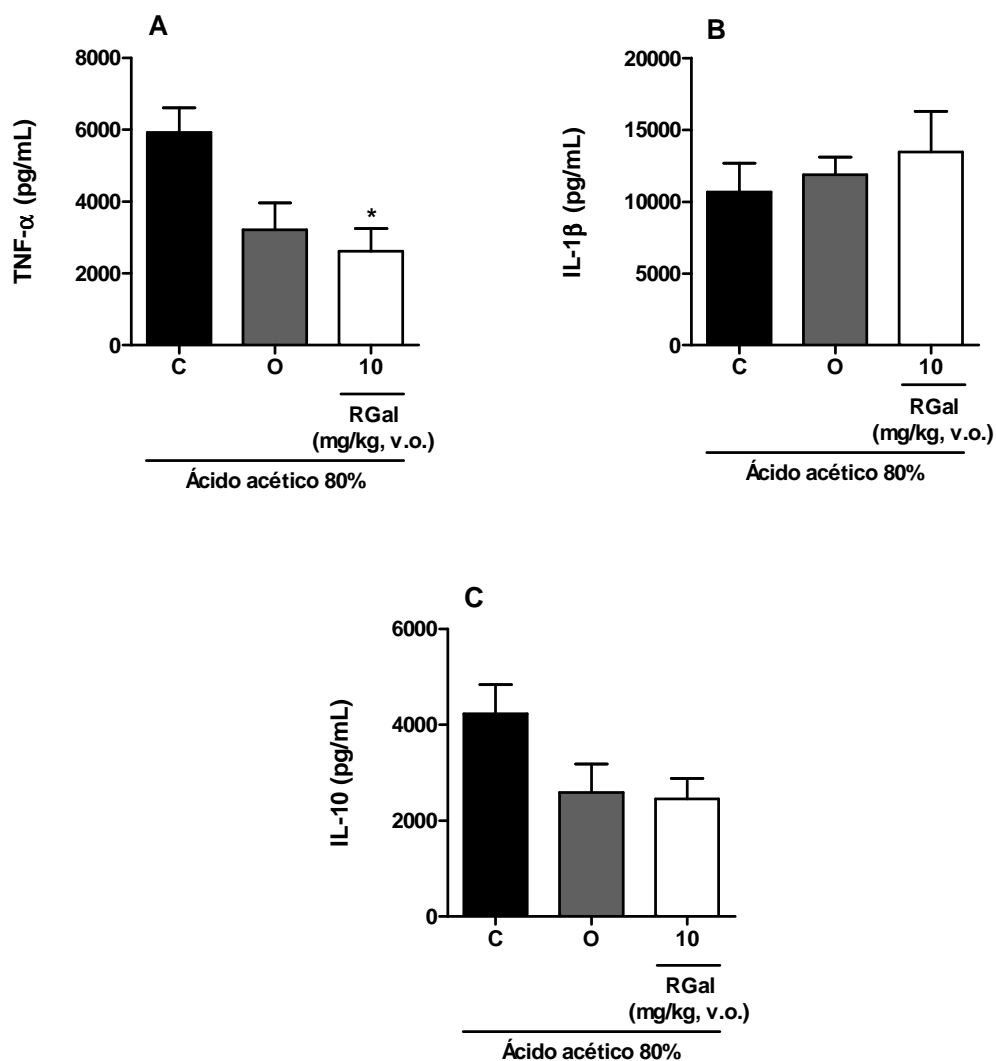


**Figura 18.** Efeito do RGal sobre os níveis da NAG da mucosa gástrica após a indução de úlcera gástrica crônica por ácido acético 80% em ratas. Os animais foram tratados pela via oral com veículo (C: água - 1 ml/kg), omeprazol (O: 40 mg/kg) ou RGal (10 mg/kg) durante sete dias a partir do segundo dia após a indução da úlcera. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão das médias ( $n = 6$ ). A comparação entre os grupos foi realizada através da análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de Bonferroni. # Diferente do grupo naive para  $P < 0,05$  e \* Diferente do grupo controle para  $P < 0,05$ .

#### 4.11 Efeito do RGal sobre os níveis de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ e IL-10

O tratamento oral com RGal (10mg/kg) foi capaz de diminuir os níveis de TNF- $\alpha$  em 55% quando comparado com o grupo controle (C:  $5925 \pm 690$ , pg/mL) (Fig. 19 A). Porém, não foram observadas diferenças significativas em relação aos níveis de IL-1 $\beta$  e IL-10 (Fig. 19 B e 19 C). Também não foram observadas diferenças significativas em

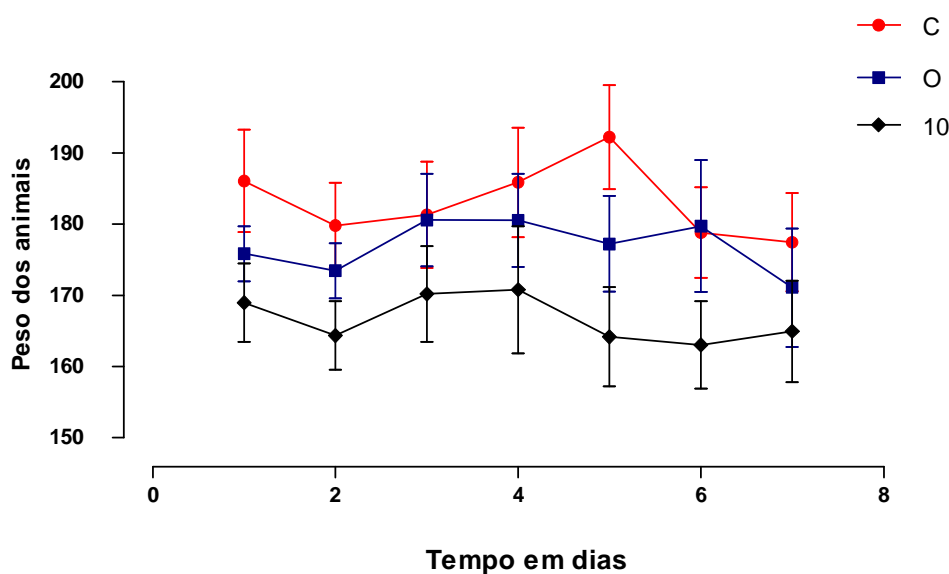
nenhuma das dosagens em relação ao controle positivo do teste (omeprazol, 40 mg/kg, v.o.), quando comparado com o grupo controle (água, 1 ml/kg).



**Figura 19.** Efeitos do RGal sobre os níveis de TNF- $\alpha$  (Painel A), IL-1 $\beta$  (Painel B) e IL-10 (Painel C). Os animais foram tratados pela via oral com veículo (C: água - 1 ml/kg), omeprazol (O: 40 mg/kg) ou RGal (10 mg/kg) durante sete dias a partir do segundo dia após a indução da úlcera. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão das médias ( $n = 6$ ). A comparação entre os grupos foi realizada através da análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de Bonferroni. \* Diferente do grupo controle para  $P < 0,05$ .

#### 4.12 Efeito do tratamento de 7 dias com o RGal sobre parâmetros toxicológicos

O tratamento dos animais com RGal (10 mg/kg, v.o.), 2 vezes ao dia durante 7 dias, não alterou o peso corporal (Fig.20) ou o peso relativo dos órgãos selecionados quando comparados com o grupo controle (Tabela 2). Ainda com este mesmo tratamento, não foram observadas mudanças nos parâmetros bioquímicos analisados: ALT, AST, creatinina ou uréia (Tabela 3).



**Figura 20.** Efeito da administração oral do RGal no peso corporal dos animais na úlcera gástrica induzida por ácido acético 80% em ratas após 7 dias de tratamento. Os animais foram tratados pela via oral com veículo (C: água - 1 ml/kg), omeprazol (O: 40 mg/kg) ou RGal (10 mg/kg) durante sete dias a partir do segundo dia após a indução da úlcera. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão das médias ( $n = 6$ ). A comparação entre os grupos foi realizada através da análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida pelo teste de Bonferroni.



**Tabela 2.** Efeito da administração oral do RGal no peso relativo dos órgãos na úlcera gástrica induzida por ácido acético 80% em ratas.

**Peso dos órgãos (%)**

<b>Tratamento</b>	<b>Controle</b>	<b>Omeprazol</b>	<b>10 mg/kg Rgal</b>
<b>Fígado</b>	3,1031 ± 0,1	3,5830 ± 0,1	3,3927 ± 0,1
<b>Pulmões</b>	0,6111 ± 0,01	0,6149 ± 0,01	0,7693 ± 0,01
<b>Coração</b>	0,3915 ± 0,1	0,4708 ± 0,1	0,4454 ± 0,1
<b>Rim Esquerdo</b>	0,3482 ± 0,1	0,4007 ± 0,1	0,3598 ± 0,1
<b>Rim Direito</b>	0,3651 ± 0,1	0,4137 ± 0,1	0,3785 ± 0,1
<b>Adrenal Esquerda</b>	0,0158 ± 0,01	0,0209 ± 0,01	0,0169 ± 0,01
<b>Adrenal Direita</b>	0,0203 ± 0,01	0,0175 ± 0,01	0,0203 ± 0,01
<b>Útero</b>	0,0757 ± 0,01	0,0887± 0,01	0,0704± 0,01
<b>Ovários</b>	0,0423± 0,1	0,0407± 0,01	0,0508 ± 0,01

Os resultados estão expressos como média ± erro padrão das médias (n = 6). A comparação entre os grupos foi realizada através da análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de Bonferroni.

**Tabela 3.** Efeito da administração oral do RGal nos parâmetros bioquímicos analisados: AST, ALT, creatinina ou uréia após úlcera gástrica induzida por ácido acético 80% em ratas.

<b>Tratamento</b>	<b>ALT</b> <b>(U/L)</b>	<b>AST</b> <b>(U/L)</b>	<b>Creatinina</b> <b>(mg/dL)</b>	<b>Ureia</b> <b>(mg/dL)</b>
<b>Naive</b>	39,73 ± 459,1	34,15 ± 476,9	0,4443 ± 0,0046	11,0 ± 2,576
<b>Controle</b>	34,43 ± 707,3	29,37 ± 732,7	0,5833 ± 0,0263	12,0 ± 2,188
<b>Omeprazol</b>	42,26 ± 762,8	34,93 ± 784,6	0,6178 ± 0,0565	13,81 ± 2,526
<b>Rgal (10 mg/kg)</b>	31,98 ± 508,1	32,10 ± 763,4	0,6566 ± 0,7651	14,83 ± 2,316

Os resultados estão expressos como média ± erro padrão das médias (n = 6). A comparação entre os grupos foi realizada através da análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de Bonferroni.

## 5. DISCUSSÃO

A úlcera péptica tem sido um grande problema para a população mundial durante mais de um século com aumento da incidência e prevalência (MALFERTHEINER *et al.*, 2009). Estima-se que este problema afeta 10% da população mundial (UYANIKOGLU, *et al.*, 2012) e cerca de 500.000 pessoas desenvolvem úlcera nos Estados Unidos a cada ano, o que resulta em impactos econômicos substanciais diretos e indiretos (RAMAKRISHNAN, *et al.*, 2007).

Ainda hoje, a etiologia exata da úlcera péptica não foi completamente elucidada, porém, acredita-se que ela resulte de um desequilíbrio entre os fatores protetores, e os agentes agressores da mucosa gástrica. As estratégias para o tratamento das úlceras pépticas são variadas, e mudaram muito ao longo dos últimos anos. Elas se estendem desde os antiácidos convencionais simples ao uso de medicamentos mais complexos e eficazes como os inibidores da bomba de prótons (IBPs), bem como terapias com antimicrobianos para erradicação da *Helicobacter pylori* e abordagens endoscópicas para o tratamento da úlcera hemorrágica (NAIK *et al.*, 2007). Dentre estas, os IBPs são as drogas mais eficazes para o tratamento da úlcera péptica. Estes fármacos atuam por inibição específica da bomba de prótons nos canálculos secretores das células parietais, que são responsáveis pela secreção de ácido no estômago (SCARPIGNATO, 2008).

Atualmente, quase duas décadas após a introdução do primeiro IBP, começam a ser relatados inconvenientes envolvendo o uso desses fármacos, tornando-se de extrema importância a contínua investigação e desenvolvimento de novas drogas para o tratamento das doenças ácido-pépticas. Por esta razão, estudos com novas alternativas terapêuticas são importantes e, dentre estas, os produtos naturais têm constituído importante fonte de

moléculas bioativas. Entre estes possíveis agentes, podemos dar enfoque aos polissacarídeos que possuem uma grande variedade de atividades biológicas, incluindo atividade antiviral, antitumoral, imunoestimulante, antiinflamatória, antinociceptiva, anticoagulante, hipoglicêmica e antiúlcera (SRIVASTAVA e KULSHVESHTHA, 1989; YAMADA, 1994; CAPEK *et al.*, 2003; NERGARD *et al.*, 2005; CIPRIANI *et al.*, 2006, SMIDERLE *et al.*, 2008). Devido a essas atividades interessantes, o objetivo deste trabalho foi de avaliar o efeito protetor e cicatrizante gástricos do polissacarídeo ramnogalacturonana (RGal) isolado da *Acmella oleracea*, além dos prováveis mecanismos de ação envolvidos.

Estudos anteriores têm demonstrado que os polissacarídeos isolados de diferentes fontes possuem atividade gastroprotetora tanto em modelos de lesão aguda quanto em modelos crônicos (SRIKANTA *et al.*, 2010; YANG *et al.*, 2012; AUSTARHEIM *et al.*, 2012). Recentemente, nosso grupo de pesquisa demonstrou que o tratamento oral dos animais com RGal protegeu a mucosa gástrica de ratas contra lesões gástricas induzidas por etanol com DE<sub>50</sub> de 1,5 mg/kg (NASCIMENTO *et al.*, 2013).

O etanol, assim como o ácido clorídrico e as espécies reativas de oxigênio está entre os vários fatores que promovem lesão na mucosa gástrica (HAM e KAUNITZ, 2007). Sabe-se que ele penetra rapidamente na mucosa gástrica, destruindo os fatores de proteção, como a barreira de muco e os grupos sulfidrílicos não protéicos (NP-SH), aumentando a permeabilidade vascular e provocando hemorragias (SZABO *et al.*, 1985; WALLACE, 2001), culminando com a formação de lesões gástricas (REPETTO e LLESUY, 2002). Esses efeitos provavelmente se devem a ações de lipoperoxidação e formação de radicais livres, estresse oxidativo intracelular e despolarização da membrana mitocondrial que precedem à morte celular (REPETTO & LLESUY, 2002). Além da proteção da mucosa

gástrica contra lesões induzidas por etanol obtida com o RGal administrada oralmente, também foi observado essa mesma citoproteção quando o polissacarídeo foi administrado pela via intraperitoneal. Com esses dados podemos descartar uma possível formação de barreira física pelo RGal sobre a mucosa gástrica, e sugerir que o polissacarídeo tem ação sistêmica.

Para investigar os mecanismos envolvidos na atividade gastroprotetora apresentada pelo RGal, quantificou-se os níveis de muco e GSH da mucosa gástrica. A barreira muco-bicarbonato constitui a primeira linha de defesa da mucosa gástrica contra agentes nocivos químicos, irritantes (principalmente o ácido clorídrico), bem como contra lesões mecânicas, bacterianas ou enzimáticas (KONTUREK *et al.*, 2004). O muco quando secretado pelas células epiteliais de superfície forma uma barreira protetora sobre a mucosa gástrica, mantendo um pH próximo da neutralidade (pH ~ 7,0), tornando-a capaz de responder de forma dinâmica aos fatores nocivos (ALLEN, 2005). Quando essa barreira é afetada, como por exemplo, pelo etanol, o epitélio se torna susceptível a lesões, e consequentemente pode ocorrer o desenvolvimento da úlcera gástrica. Ainda, o etanol pode causar modificações em todas as estruturas biológicas, levando ao mau funcionamento de células e tecidos, inclusive nas células da mucosa gástrica. Isto se deve ao fato de que ele está diretamente relacionado com a formação de espécies reativas de oxigênio, resultando em diminuição dos níveis de GSH e das demais enzimas antioxidantes. A glutathione reduzida é um antioxidante endógeno essencial presente nas células, encontrada em todos os tipos de tecidos de mamíferos, mas em maior quantidade no fígado. A GSH possui várias funções, dentre elas, a capacidade de eliminar espécies reativas de oxigênio, e também prevenção da formação dos mesmos, sendo de extrema importância para limitar a toxicidade do etanol, bem como muitos outros produtos tóxicos. Esta molécula ainda pode reduzir peróxidos e se

complexar com compostos eletrofílicos protegendo estruturas celulares importantes como o DNA e os lipídeos (KUMAR DAS *et al.*, 2007). Os dados obtidos demonstram que a gastroproteção promovida pelo RGal administrada pela via oral não envolve a manutenção dos principais fatores de proteção da mucosa gástrica, GSH e muco. Porém, SRIKANTA *et al.*, (2010), observaram um aumento dos níveis de GSH com o tratamento dos animais com um polissacarídeo péptico isolado da *Decalepis hamiltoni* após a indução de lesões gástricas induzidas por estresse ou por etanol. Interessantemente, o RGal quando administrada pela via intraperitoneal também foi capaz de reduzir a área lesada da mucosa gástrica pelo etanol, e surpreendentemente, manteve os níveis de muco gástrico próximos aos níveis do animal não lesionado. Esses dados indicam que, pelo menos em parte, o efeito protetor promovido pelo RGal (i.p.) nas úlceras gástricas induzidas por etanol se deve à prevenção da depleção do muco protetor gástrico. Esse mecanismo também foi sugerido por Sun *et al.*, 1991, para outro polissacarídeo, enfatizando a importância desse fator para a gastroproteção.

Continuando com a investigação dos prováveis mecanismos envolvidos na atividade gastroprotetora do RGal, nós avaliamos a ação do composto sobre a secreção ácida gástrica. A secreção ácida constitui um fator agressor endógeno da mucosa gástrica e juntamente com as enzimas proteolíticas secretadas no estômago, podem contribuir para o aparecimento e desenvolvimento de lesões no estômago. Na verdade, os medicamentos mais amplamente comercializados nos dias de hoje para o tratamento de úlceras são drogas anti-secretoras ácida como os antagonistas de receptores H<sub>2</sub> (cimetidina e ranitidina) e os inibidores da bomba de prótons (omeprazol e pantoprazol) (GILL *et al.*, 2011). A secreção de ácido junto à mucosa é regulada pelo sistema nervoso central e entérico, células neuroendócrinas e do sistema imune, as quais atuam na modulação parácrina e hormonal. A

mucosa do corpo gástrico, e em menor quantidade o fundo e o antro possuem células parietais que secretam o ácido clorídrico. Essas células possuem a enzima  $H^+-K^+ATPase$  ou bomba de prótons, a qual é ativada pela interação da histamina, gastrina e acetilcolina com seus respectivos receptores e que são responsáveis pela produção de HCl. Nossos resultados demonstraram que o RGal, quando administrada por via intraduodenal ou por via oral em animais com hipersecreção induzida por ligadura do piloro, não foi capaz de alterar tanto o volume quanto a acidez total do conteúdo gástrico, descartando a redução da secreção ácida gástrica no mecanismo de gastroproteção do RGal. Ao contrário do observado em nossos experimentos, Yamada *et al.*, (1995) mostraram que um polissacarídeo isolado da *Bupleurum falcatum* L. possui ação gastroprotetora também através da diminuição da secreção de ácido e pepsina. Entretanto, a arabinogalactana isolada da *Maytenus ilicifolia* também não foi efetiva em reduzir a secreção ácida gástrica (BAGGIO *et al.*, 2012), sugerindo que o tipo de estrutura dos polissacarídeos influencia na sua atividade.

Devido ao fato do RGal apresentar uma importante atividade gastroprotetora no modelo de lesões gástricas agudas induzidas por etanol, e se mostrar uma molécula interessante e promissora por estimular a produção de muco gástrico em todas as doses testadas quando administrado por via intraperitoneal, nós também investigamos o efeito do RGal na cicatrização da úlcera crônica induzida por ácido acético, o modelo experimental de úlcera em animais que mais se assemelha às úlceras que ocorrem em humanos.

O modelo de úlcera crônica induzida por ácido acético é um modelo experimental já bem estabelecido e utilizado por diversos pesquisadores para elucidar os mecanismos envolvidos na cicatrização e cura da úlcera gástrica. É o modelo que mais se assemelha com a úlcera em humanos tanto em termos de características patológicas e a localização,

quanto aos mecanismos de cicatrização (TSUKIMI *et al.*, 1994). Quando o ácido acético entra em contato com a mucosa, ele induz a úlcera gástrica que se inicia com lesão vascular e necrose isquêmica. Além disso, vários outros mecanismos destrutivos podem estar envolvidos na formação da úlcera, como por exemplo, destruição da barreira protetora gástrica, formação de espécies reativas de oxigênio, alterações na microcirculação, fatores de crescimento e produção de PG, óxido nítrico, citocinas, e apoptose celular, além de mudanças no padrão de aderência do muco (OKABE *et al.*, 2005). A cicatrização da úlcera gástrica é um processo complexo que envolve a reparação do tecido gástrico lesionado através de formação de tecido de granulação, reepitelização e remodelamento da matriz extracelular levando à reconstrução da barreira da mucosa. Todo esse processo inclui o restabelecimento da superfície epitelial, reorganização das glândulas mucosas, aumento da síntese e liberação de mucina gástrica, proliferação, migração e diferenciação celular (TARNAWSKI *et al.*, 2010). Nossos resultados demonstraram que o tratamento dos animais com RGal, duas vezes ao dia por sete dias consecutivos, diminuiu significativamente a extensão da lesão induzida por ácido acético, acelerando o processo de cicatrização, sendo confirmado pelas análises histológicas coradas com eosina e hematoxilina. Nesses cortes é possível observar que a úlcera formada com a aplicação do ácido acético é caracterizada por uma lesão necrótica profunda e ruptura da continuidade da parede da mucosa gástrica. Em contrapartida, as análises histológicas revelam que no tratamento com RGal, o tecido da mucosa está muito mais contínuo e organizado, sugerindo a regeneração e cicatrização da mucosa gástrica. Corroborando nossos dados, Matsumoto *et al.* (2002) também encontraram ação gastroprotetora para o polissacarídeo isolado da *Bupleurum falcatum* L., com aceleração significativa na cicatrização da úlcera gástrica crônica induzida por ácido acético, comprovados por imagens microscópicas da



lesão. Além disso, Ye *et al.* (2002) também demonstraram o mesmo efeito para o polissacarídeo isolado da *Angelica sinensis*.

Além disso, o processo essencial de cicatrização da úlcera gástrica requer a restauração da continuidade do epitélio para proteger o tecido de granulação da lesão mecânica e química (TARNAWSKI e AHLUWALIA 2012). Essa re-epitelização requer proliferação celular, e depois, migração dessas novas células para a margem da úlcera. Durante a proliferação celular, o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), desempenha um papel fundamental no ciclo de renovação celular e pode funcionar como um marcador tecidual (CZYZEWSKA *et al.*, 2009). Nós observamos que a administração oral do RGal foi capaz de aumentar o número de células em proliferação na região de regeneração da úlcera, sendo evidenciado pelo aumento da coloração em relação aos ratos tratados somente com o veículo. Com esses dados, é possível concluir que, pelo menos em parte, a proliferação celular contribui para a cicatrização da úlcera promovida pelo polissacarídeo.

Como mencionado anteriormente, está bem estabelecido que o muco contribui significativamente para o reparo dos danos na mucosa gástrica. O muco é um fator protetor importante que reveste continuamente a mucosa gástrica e é a primeira linha de defesa contra agentes nocivos como o ácido ou bactérias (PHILLIPSON *et al.*, 2008). Ele é composto por 95% de água e 5% de glicoproteínas, as quais são denominadas mucinas, formando um gel viscoso, elástico, aderente e transparente, o qual retarda a difusão do ácido para a mucosa gástrica (BERNE *et al.*, 2004). Nossos resultados demonstraram que o tratamento dos animais com RGal foi capaz de prevenir a redução das glicoproteínas (mucinas), observada pelo aumento da intensidade na coloração de PAS, o que indica o envolvimento do muco gástrico na atividade cicatrizante deste composto. O fato de que o

muco gástrico é um fator protetor essencial, e contribuiu para a manutenção da integridade da mucosa também foi demonstrado por Srikanta *et al.*, (2010), onde o tratamento com um polissacarídeo isolado das raízes da *Decalepis hamiltonii* foi capaz de aumentar a produção de mucina durante a cicatrização da úlcera neste mesmo modelo.

Sabe-se que a úlcera resulta de necrose tecidual desencadeada por isquemia da mucosa, formação de radicais livres e baixo suprimento de oxigênio e nutrientes (TARNAWSKI e AHLUWALIA 2012). Esses eventos iniciam uma fase inflamatória no desenvolvimento da úlcera, com recrutamento e ativação metabólica de neutrófilos gerando radicais livres (FIALKOW *et al.*, 2007). A inflamação na mucosa gástrica é um fator crucial para a recorrência da ulcera péptica (KAZUSHI *et al.*, 2005). No modelo de úlcera gástrica experimental induzida por ácido acético, a resposta inflamatória tem grande importância e promove várias alterações e mudanças associadas com um infiltrado inflamatório celular (OKABE *et al.*, 2005). Deste modo, para analisar o processo inflamatório que ocorre durante o processo de cicatrização da úlcera gástrica, decidimos avaliar a infiltração de neutrófilos e macrófagos na área ulcerada através dos níveis da enzima mieloperoxidase (MPO) e N-acetil-glicosidase (NAG), respectivamente. A MPO é descrita como um marcador indireto da infiltração de leucócitos polimorfonucleares na resposta inflamatória em uma variedade de modelos experimentais (BRADLEY *et al.*, 1982). A MPO é uma enzima que tem como função promover a formação de espécies reativas de oxigênio auxiliando na destruição de agentes patogênicos (ARNHOLD, 2003), sua atividade é frequentemente encontrada elevada na úlcera gástrica, e diminuída após a cicatrização (GUHA *et al.*, 2009). O aumento dos níveis da MPO observado no grupo controle após indução da úlcera crônica com ácido acético indica uma quantidade significativa de neutrófilos ativos, sugerindo assim a presença de uma resposta inflamatória

no tecido ulcerado (MATSUI, *et al.*, 2001). Já a NAG é descrita como uma enzima produzida por leucócitos mononucleares e usada como um indicador da infiltração dessas células no sítio inflamatório, indicando um processo inflamatório crônico (BAILEY, 1988). Em nossos experimentos, foi possível observar que a aplicação do ácido acético sobre a serosa gerou um aumento da atividade da enzima MPO, evidenciando um aumento da infiltração de neutrófilos no local da lesão. Entretanto, o tratamento com o RGal foi capaz de diminuir os níveis de MPO, sugerindo redução da infiltração apenas de neutrófilos na área lesionada. Não foi possível observar diferença significativa na atividade da NAG após o tratamento com RGal. Entretanto, no modelo de quantificação da MPO *in vitro*, quando as amostras foram incubadas diretamente com diferentes concentrações do RGal, não foram encontradas alterações nos níveis da atividade da MPO, sugerindo que provavelmente o polissacarídeo não inibe diretamente a atividade desta enzima. E de fato, isso pode contribuir para a redução da formação de espécies reativas de oxigênio dependente de neutrófilos e, conseqüentemente, promover melhoria no processo inflamatório induzido por ácido acético, atenuando o dano na mucosa gástrica.

Durante a inflamação, a úlcera crônica também é acompanhada por produção de citocinas, que são proteínas produzidas principalmente por macrófagos e células Th em resposta a estímulos inflamatórios. Na fase inicial da úlcera gástrica, a perturbação do estado redox, necrose tecidual e liberação de leucotrienos B atraem macrófagos e leucócitos polimorfonucleares que liberam citocinas pró-inflamatórias tais como o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e a interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) (as quais têm seus níveis reduzidos ao longo da cicatrização), e também citocinas antiinflamatórias, tais como a interleucina-10 (IL-10) (TARNAWSKI e AHLUWALIA 2012). O TNF- $\alpha$  tem papel central na iniciação da cascata de citocinas e outros fatores que constituem a resposta imune. Além de muitas atividades

biológicas, tanto o TNF- $\alpha$  quanto a IL-1 $\beta$  estão envolvidas na indução de lesão e inflamação em uma variedade de tecidos, bem como na mucosa gástrica (TROOST *et al.*, 2003), e associada com infecção por *Helicobacter pylori*, uso de antiinflamatórios não esteroidais e etanol. O papel essencial da IL-1 $\beta$  no processo inflamatório é confirmado pelo fato de que a administração do antagonista do seu receptor impede a liberação de mediadores pró-inflamatórios e reduz a gravidade da inflamação e dano nos tecidos (DINARELLO, 1993). Já a IL-10, uma potente citocina pleiotrópica, é uma importante citocina antiinflamatória (MOORE *et al.*, 2001), também está envolvida no processo inflamatório, bem como na manutenção e regulação da severidade da úlcera gástrica (ROGLER e ANDUS, 1998).

Uma vez que a estimulação de citocinas inflamatórias é de grande importância para a barreira de defesa da mucosa, nós decidimos avaliar a participação das citocinas pró e antiinflamatórias durante o processo de cicatrização da úlcera gástrica, através da quantificação dos níveis de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-10. Com os nossos dados, foi possível observar um aumento significativo dos níveis de TNF- $\alpha$  nos ratos tratados somente com o veículo após indução da úlcera crônica por ácido acético. Entretanto, o tratamento com RGal foi capaz de diminuir os níveis de TNF- $\alpha$ , citocina conhecida por comprometer a cicatrização da úlcera gástrica e interagir com a restituição e a angiogênese da mucosa (HARSCH *et al.*, 2003), sugerindo a participação da redução desta citocina na cicatrização promovida por RGal. Em relação aos níveis de IL-1 $\beta$  e nos níveis de IL-10 não foram encontradas diferenças significativas em ambas as citocinas após o tratamento com RGal, descartando o envolvimento das mesmas no mecanismo de gastroproteção do RGal.

Reforçando o fato de que o restabelecimento da homeostasia da mucosa gástrica através do sistema antioxidante é de extrema importância e buscando compreender melhor

os mecanismos pelo qual o polissacarídeo promove a melhora da úlcera crônica induzida por ácido acético, nós avaliamos também a capacidade antioxidante do RGal, e as possíveis alterações promovidas nos sistemas antioxidantes.

Existem muitas evidências de que as espécies reativas de oxigênio desempenham papel fundamental no dano tecidual através de diversos mecanismos, incluindo danos em várias moléculas e indução de morte celular programada (FINKEL e HOLBROOK, 2000). Os antioxidantes protegem os sistemas biológicos e desempenham um papel importante contra a produção excessiva de radicais livres que podem ocorrer durante a formação da úlcera gástrica (DEVI *et al.*, 2007). Radicais livres como o ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) ou o radical hidroxil ( $\bullet OH$ ) e espécies consideradas não-radicais como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) são produzidos por NADPH oxireductase em neutrófilos ativados e geram constantemente estresse oxidativo e peroxidação lipídica com conseqüente dano tecidual (ZIMMERMAN *et al.*, 1988; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). Essa peroxidação lipídica contribui para o desenvolvimento da lesão na mucosa gástrica (DEMIR *et al.*, 2003).

O processo oxidativo pode ser caracterizado, entre outros fatores, pela peroxidação lipídica da membrana das células do tecido lesado. O estresse oxidativo pode ser descrito como resultado de um desequilíbrio dos mecanismos de defesa do organismo em relação ao número de substâncias oxidantes produzidas pelo agente indutor da lesão, ou ainda por alterações bioquímicas do próprio organismo (LIH-BRODY *et al.*, 1996). De fato, nossos dados mostraram que existe um aumento das espécies reativas de oxigênio na área ulcerada evidenciada pelo aumento dos níveis de LOOH nos animais tratados com veículo. Entretanto, foi possível observar que administração oral de RGal foi capaz de diminuir de

maneira significativa os níveis de LOOH da mucosa gástrica, contribuindo para a melhora do dano tecidual.

A glutathiona reduzida (GSH) é encontrada em altas concentrações na mucosa gástrica de ratos e humanos (BODY *et al.*, 1979). Ela é considerada uma molécula bastante importante para a conservação da integridade da mucosa (HOPPENKAMPS *et al.*, 1984). O GSH participa diretamente como um potente antioxidante e indiretamente como substrato para várias outras enzimas antioxidantes, tais como: glutathiona S-transferase (GST), glutathiona peroxidase (GPx) e glutathiona redutase (GR) (CNUBBEN *et al.*, 2001). Sob condições de estresse oxidativo, as espécies reativas de oxigênio são reduzidas por GSH com concomitante formação do dissulfeto oxidado: a GSSG (ou glutathiona oxidada) (CNUBBEN *et al.*, 2001). Nos nossos experimentos foi possível observar uma diminuição dos níveis de GSH após indução da lesão com ácido acético. Entretanto, a administração oral de RGal não foi capaz de prevenir a depleção dos níveis de GSH.

O organismo possui diversos sistemas enzimáticos que previnem a ação destrutiva das espécies reativas de oxigênio. As enzimas antioxidantes, incluindo superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPx) e glutathiona S-transferase (GST), possuem um papel importante na patogênese das úlceras induzidas por ácido acético (REPETTO e LLESUY, 2002). Altas concentrações de ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) ativam a SOD, a qual catalisa a dismutação do radical em um composto menos nocivo, o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), que é inativado pela sua degradação em água pela CAT ou GPx (KWIECIEŃ *et al.* 2004). A GST atua nas reações de conjugação juntamente com GSH. Quando ligada no estado ativo, permite ao GSH formar ligações tio-éter com o agente oxidante em seu sítio eletrofílico, resultando em um composto menos reativo quimicamente (SCHULTZ *et al.*, 1997).

A aplicação do ácido acético sobre a mucosa gástrica promoveu uma diminuição na atividade da SOD, e também uma diminuição da atividade da enzima GST no grupo tratado somente com o veículo. Porém, o tratamento com RGal foi capaz de reverter a atividade enzimática tanto da SOD quanto da GST para os níveis basais, semelhantes aos níveis apresentados pelos animais não lesionados. Esses dados sugerem baixos níveis de radicais livres na mucosa gástrica de animais tratados com o polissacarídeo. Ainda, esses resultados foram complementados com o ensaio *in vitro* do radical DPPH, onde o RGal demonstrou uma atividade sequestradora do mesmo. Além disso, de acordo com o nosso resultado, outro polissacarídeo (arabinogalactana) também apresentou atividade de seqüestro de radicais livres (BAGGIO *et al.*, 2012). Esses resultados sugerem que no efeito cicatrizante do polissacarídeo há o envolvimento da atividade antioxidante.

Assim como observado em nossos resultados em relação ao estresse oxidativo, Yang *et al* (2012), também mostraram que os efeitos gastroprotetores do polissacarídeo isolado do *Pleurotus ostreatus* podem ser atribuídos, pelo menos em parte, aos seus efeitos sobre o sistema antioxidante. De maneira semelhante ao nosso trabalho, os autores também encontraram uma diminuição da atividade enzimática da SOD, e um aumento dos níveis de LOOH após indução de úlcera crônica por ácido acético, que foram revertidos para próximo dos níveis basais após o tratamento com o polissacarídeo. Porém, ao contrário do que nós observamos em nossos dados, os autores encontraram baixos níveis de GSH após indução da lesão, os quais foram restabelecidos após o tratamento com o polissacarídeo.

Uma vez que existe uma grande preocupação quanto à toxicidade das plantas medicinais quando utilizadas para o tratamento de patologias, também é de interesse os resultados da exposição subcrônica dos animais ao polissacarídeo. O tratamento com RGal não apresentou efeito tóxico aparente pois não foram observadas alterações clínicas e

comportamentais. Adicionalmente, não houve diferença significativa entre os grupos em relação ao peso corporal, e não foram observadas alterações macroscópicas e diferenças nos pesos dos órgãos selecionados (adrenais, baço, coração, fígado, pulmão, rins, ovários e útero). Para complementar esses resultados, amostras de sangue foram coletadas dos animais ao final do tratamento para avaliação dos seguintes parâmetros bioquímicos: alanina aminotransferase (ALT), (indicador de lesão hepática aguda), aspartato aminotransferase (AST), (indicador de lesão hepática e muscular), creatinina e uréia (indicadores de lesão renal). Entretanto, não foram observadas alterações nos parâmetros bioquímicos com a administração do RGal. Em conjunto, os resultados obtidos sugerem que administração subcrônica do RGal (7 dias) é relativamente segura, no entanto exposições mais prolongadas e outros parâmetros toxicológicos devem ser realizados com o intuito de garantir sua segurança.

Coletivamente, nossos resultados demonstraram que o RGal isolado da *Acmella oleracea* possui efeito gastroprotetor e cicatrizante gástrico importante, podendo se tornar uma interessante opção terapêutica para o tratamento da úlcera gástrica.



## 6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos demonstraram que:

- O RGal protegeu a mucosa gástrica contra lesões induzidas por etanol P.A., tanto administrada pela via oral (v.o.) quanto pela via intraperitoneal (i.p.);
- O efeito gastroprotetor da RGal, quando administrada i.p., está associado com a manutenção do fator protetor como o muco gástrico;
- O Rgal acelerou a cicatrização de úlceras induzidas por ácido acético 80% através do aumento da proliferação celular e do conteúdo de mucina gástrica;
- A cicatrização acelerada da úlcera gástrica também está relacionada com a diminuição do processo inflamatório, através da redução da migração de neutrófilos e dos níveis de TNF- $\alpha$ ;
- A modulação do sistema antioxidante também está envolvida no processo de cicatrização da úlcera promovida pelo RGal, através da diminuição dos níveis de LOOH e aumento dos níveis de GSH e da atividade da SOD e GST;
- A RGal apresentou atividade sequestradora do radical DPPH *in vitro*;
- O tratamento dos animais com o RGal não provocou alterações dos sinais clínicos ou comportamentais e não alterou o peso corporal e dos órgãos selecionados ou parâmetros bioquímicos plasmáticos.

Em conjunto, nossos dados demonstram o efeito gastroprotetor e cicatrizante gástrico do RGal isolado da *Acmella oleracea*. Este efeito pode estar associado com o aumento de fatores protetores da mucosa gástrica, como a manutenção do muco gástrico,

proliferação celular, redução da infiltração de neutrófilos e de citocinas pró-inflamatórias, acompanhado de melhora no processo inflamatório e o envolvimento de defesas antioxidantes. Entretanto, mais estudos são necessários para investigar os mecanismos complementares envolvidos com a proteção gástrica promovido pelo RGal.

## 7. REFERÊNCIAS

ALLEN A, FLEMSTRÖM, G. (2005). "Gastroduodenal mucus bicarbonate barrier: protection against acid and pepsin." American Journal of Physiology - Cell Physiology **288**: C1–C19.

ARAKAWA, T., WATANABE, T., TANIGAWA, T., TOMINAGA, K., FUJIWARA, Y., MORIMOTO, K. (2012). "Quality of ulcer healing in gastrointestinal tract: its pathophysiology and clinical relevance." World Journal of Gastroenterology **18**(35): 4811-4822.

ARNHOLD, J. (2003). "Free radicals – Friends or foes? Properties, functions, and secretion of human myeloperoxidase." Biochemistry **69**(1): 4-9.

AUSTARHEIM, I., MAHAMANE, H., SANOGO, R., TOGOLA, A., KHALEDABADI, M., VESTRHEIM, A.C., INNGJERDINGEN, K.T., MICHAELSEN, T.E., DIALLO, D., PAULSEN, B.S. (2012). "Anti-ulcer polysaccharides from Cola cordifolia bark and leaves." Journal of Ethnopharmacology **143**(1): 221-227.

BAGGIO, C. H., FREITAS, C.S., OTOFUJI, G.M., CIPRIANI, T.R., SOUZA, L.M., SASSAKI, G.L., IACOMINI, M., MARQUES, M.C.A., MESIA-VELA, S. (2007). "Flavonoid-rich fraction of Maytenus ilicifolia Mart. ex. Reiss protects the gastric mucosa of rodents through inhibition of both H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup> -ATPase activity and formation of nitric oxide." Journal of Ethnopharmacology **113**(3): 433-440.

BAGGIO, C. H., FREITAS, C. S., TWARDOWSCHY, A., DOS SANTOS, A. C., MAYER, B., POTRICH, F. B., CIPRIANI, T. R., SASSAKI, G. L., IACOMINI, M., MARQUES, M. C., MESIA-VELAA, S. (2012). "In vivo/in vitro studies of the effects of the type II arabinogalactan isolated from Maytenus ilicifolia Mart. ex Reissek on the gastrointestinal tract of rats." Zeitschrift Naturforschung C – A Journal of Biosciences **67**(7-8): 405-410.

BAILEY, P. J. (1988). "Sponge implants as models." Methodology in Immunology **162**: 327-334.

BAEK, S. H., LEE, J. G., PARK, S. Y., BAE, O. N., KIM, D. H., PARK, J. H. (2010). "Pectic Polysaccharides from *Panax ginseng* as the Antirotavirus Principals in Ginseng." Biomacromolecules **11**(8): 2044–2052.

BAKER, D. D., CHU, M., OZA, U., RAJGARHIA, V. (2007). "The value of natural products to future pharmaceutical discovery." Natural Product Report **24**: 1225–1244.

BERNE, R. M., LEVY, M.N., KOEPPEN, B.M., STANTON, B.A (2004). "Fisiologia: 5 edição - Rio de Janeiro." Elsevier.

BIONDO, T. M., TANAE, M.M., COLETTA, E.D., LIMA-LANDMAN, M.T., LAPA, A.J., SOUCCAR, C. (2011). "Antisecretory actions of *Baccharis trimera* (Less.) DC aqueous extract and isolated compounds: analysis of underlying mechanisms." Journal of Ethnopharmacology **136**(2): 368-373.

BLOIS, M. S. (1958). "Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical." Nature **181**: 199 – 1200.

BODY, S. C., SASAME, H.A., BODY, M.R. (1979). "High concentrations of glutathione in glandular stomach: possible implications for carcinogenesis." Science **205**: 1010–1012.

BOONEN, J., BAERT, B., BURVENICH, C., BLONDEEL, P., DE SAEGER, S., DE SPIEGELEER, B. (2010). "LC-MS profiling of N-alkylamides in *Spilanthes acmella* extract and the transmucosal behaviour of its main bio-active spilanthol." Journal of Pharmaceutical Biomedical Analysis. **53**(3): 243-249.

BRADLEY P.P., P. D. A., CHRISTENSEN R.D., ROTHSTEIN G. (1982). "Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker." Journal Investigative of Dermatology **78**: 206-209.

BRANDÃO, E. M., ANDRADE, C.T. (1999). "Influência de fatores estruturais no processo de gelificação de pectinas de alto grau de metoxilação." Polímeros **9**(3): 38-44.

CAPEK, P., HRIBALOVÁ, V., SVANDOVÁ, E., EBRINGEROVÁ, A., SASINKOVÁ, V., MASAROVÁ, J (2003). "Characterization of immunomodulatory polysaccharides from *Salvia officinalis* L." International Journal of Biological Macromolecules **33**: 113-119.

CARPITA, N. C., MCCANN, M. (2000). "The cell wall. In: Buchanan, B.B.; Gruissem, W.; Jones, R.L. ." Biochemistry & Molecular Biology of Plants. USA: Courier.

CAVALCANTI, V. M. S. (2008). "Extração de espilantol de *Spilanthes acmella* var. oleracea com dióxido de carbono supercítico.165f. ." Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

CHAKRABORTY, A., DEVI, R. K. B., RITA, S., SHARATCHANDRA, K., SINGHT, T. I. (2004). "Preliminary studies on antiinflammatory and analgesic of *Spilanthes acmella* in experimental animal models." Indian Journal of Pharmacology **36**: 148-150.

CHAKRABORTY, A., DEVI, R. K. B., SANJEBAM, R., KHUMBONG, S., THOKCHOM, I. S. (2010). "Preliminary studies on local anesthetic and antipyretic activities of *Spilanthes acmella* Murr. in experimental animal models." Indian Journal of Pharmacology **42**: 277-279.

CHUBINEH, S., BIRK, J. (2012). "Proton pump inhibitors: the good, the bad, and the unwanted." Southern Medical Journal **105**(11): 613-618.

CIPRIANI, T. R., MELLINGER, C. G., SOUZA, L. M., BAGGIO, C. H., FREITAS, C. S., MARQUES, M. C. A., GORIN, P. A. J., SASSAKI, G. L., & IACOMINI, M. (2006). "Polysaccharide from a tea (infusion) of *Maytenus ilicifolia* leaves with anti-ulcer protective effects." Journal of Natural Products **69**: 1018-1021.

CNUBBEN, N. H. P., KIM, Y. C. M., WORTELBOER, H. VAN ZANDEN, J. & VAN BLADEREN, P. J. (2001). "The interplay of glutathione-related processes and antioxidant defense." Environmental Toxicology and Pharmacology **10**: 141-152.

CORNE, S. J., MORRISSEY, S. M., WOODS, R. J. (1974). "A method for the quantitative estimation of gastric barrier mucus" Journal of Physiology **242**(116P-117P).

COUTINHO, L. N. (2006). "Galhas e deformações em Jambu (*Spilanthes oleraceae* L.) causadas por *Tecaphora spilanthes* (Ustilaginales)." Summa Phytopathology **32**(3): 283-285.

CZYZEWSKA, J., GUZINSKA-USTYMOWICZ, K., PRYCZYNICZ, A., KEMONA, A., BANDURSKI, R. (2009). "Immunohistochemical assessment of Fhit protein expression in advanced gastric carcinomas in correlation with *Helicobacter pylori* infection and survival time." Folia Histochem Cytobiol **47**: 47-53.

DEFONESKA A., KAUNITZ, J. D. (2010). "Gastroduodenal mucosal defense." Current Opinion Gastroenterology **26**(6): 604-610.

DEMİR, S., YILMAZ, M., KÖSEOĞLU, M., AKALIN, N., ASLAN, D., AYDIN, and A.S. (2003). "Role of free radicals in peptic ulcer and gastritis." Turkish Journal of Gastroenterology **14**: 39-43.

DEVI, R. S., NARAYAN, S., VANI, G., SRINIVASAN, P., MOHAN, K.V., SABITHA, K.E., DEVI, C.S. (2007). "Ulcer protective effect of *Terminalia arjuna* on gastric mucosal defensive mechanism in experimental rats." Phytotherapy Research **21**: 762–767

DOMER, F. R. (1971). "Animail experiments in pharmacological analysis." Charles C. Thomas Publisher: 669.

FAVORETO, R., GILBERT, B. (2010). "*Acmella oleracea* (L.)R.K. Jansen (Asteracea) – Jambu." Revista Fitos **5**(1): 83-90.

FIALKOW, L. WANG, Y., DOWNEY, G. P. (2007). "Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function." Free Radical Biology and Medicine **2**: 153-164.

FINKEL, T., HOLBROOK, N. J. (2000). "Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing." Nature **408**: 239-247.

FREIMUND, S., SAUTER, M., KÄPPELI, O., DUTLER, H. (2003). "A new non-degrading isolation process for 1,3- $\beta$ -D-glucan of high purity from baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*." Carbohydrate Polymers **54**: 159-171.

FUKAI, T., USHIO-FUKA, M. (2011). "Superoxide Dismutases: Role in Redox Signaling." Vascular Function, and Diseases. Antioxidants & Redox Signaling **15**.

GUHA, P., DEY, A., SARKAR, B., DHYANI, M. V., CHATTOPADHYAY, S., BANDYOPADHYAY, S. K. (2009). "Improved antiulcer and anticancer properties of a trans-resveratrol analog in mice." Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics **328**: 829–838.

HABIG, W. H., PABST, M. J., JAKOBY, W. B. (1974). "Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation." Journal of Biological Chemistry **22**: 249.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. (1999). "Free Radicals in Biology and Medicine." New York: Oxford University Press(3).

HAM, M., KAUNITZ, J. (2007). "Gastroduodenal defense." Current Opinion of Gastroenterology **43**(6): 607–616.

HARSCH, I. A., BRZOSOWSKI, T., BAZELA, K., KONTUREK, S.J., KUKHARSKY, V., PAWLIK, T., PAWLOWSKI, E., HAHN, E.G., KONTUREK, P.C. (2003). "Impaired gastric ulcer healing in diabetic rats: role of heat shock protein, growth factors, prostaglandins and proinflammatory cytokines." European Journal of Pharmacology **481**(2-3): 249-260.

HELLOU, J., ROSS, N. W., MOON, T. W. (2012). "Glutathione, glutathione S-transferase, and glutathione conjugates, complementary markers of oxidative stress in aquatic biota." Environmental Science Pollution Research **19**: 2007–2023.

HIND, N., BIGGS, N. (2003). "Acmella oleracea: compositae." Curtis's Botanical Magazine **20**(1): 31-39.

HOPPENKAMPS, R., THIES, E., YOUNES, M., SIEGERS, C.P. (1984). "Glutathione and GSH dependant enzymes in the human gastric mucosa." Wien Klin Wochenschr **62**: 183–186.

JAIN, K. S., SHAH, A.K., BARIWAL, J., SHELKE, S.M., KALE, A.P., JAGTAP, J.R., BHOSALE, A.V. (2007). "Recent advances in proton pump inhibitors and management of acid-peptic disorders." Bioorganic and Medicinal Chemistry **15**: 1181-1205.

JANSEN, R. K. (1985). "The systematics of Acmella (Asteracea-Heliantheae)." Systematic Botany Monographs **8**: 1-115.



JORGE, R. M., LEITE, J.P., OLIVEIRA, A.B., TAGLIATI, C.A. (2004). "Evaluation of antinociceptive, anti-inflammatory and antiulcerogenic activities of *Maytenus ilicifolia*." Journal of Ethnopharmacology **94**: 93–100.

KALLAYA, E., SUTHILUK, P., NARUEMON, V., DUANGPORN, T. (2006). "Effects of Aloe vera and sucralfate on gastric microcirculatory changes, cytokine levels and gastric ulcer healing in rats." World Journal of Gastroenterology **7**(12): 2034-2039.

KAZUSHI, S., TOSHIHIRO, O., KATSUYA, Y. (2005). "Rebamipide Reduces Recurrence of Experimental Gastric Ulcers: Role of Free Radicals and Neutrophils." Digestive Diseases and Sciences **50**: S90–S96.

KIYOHARA, H., UCHIDA, T., TAKAKIWA, M., MATSUZAKI, T., HADA, N., TAKEDA, T., SHIBATA, T., YAMADA, H. (2010). "Different contributions of side-chains in beta-D-(1→3,6)-galactans on intestinal Peyer's patch-immunomodulation by polysaccharides from *Astragalus mongholicus* Bunge." Phytochemistry **71**(2-3): 280–293.

KLIEBENSTEIN, D. J. (2004). "Secondary metabolites and plant/environment interactions: a review through *Arabidopsis thaliana* tinted glasses." Plant Cell Environmental **27**: 675-684.

KONTUREK, S. J., KONTUREK, P. C., PAWLIK, T., SLIWOWSKI, Z., OCHMAŃSKI, W., HAHN, E. G. (2004). "Duodenal mucosal protection by bicarbonate secretion and its mechanisms." Journal of Physiology and Pharmacology **55**: 5–17.

KUMAR DAS, S., VASUDEVAN, D.M. (2007). "Alcohol-induced oxidative stress." Department of Biochemistry, Amrita Institute of Medical Sciences, Elamakkara P.O. Cochin 682 026, Kerala, India.

KWIECIEN, S., BRZOZOWSKI, T., KONTUREK, S. J. (2002). "Effects of reactive oxygen species action on gastric mucosa in various models of mucosal injury." Journal of Physiology and Pharmacology **53**: 39-50.

LAINE, L., TAKEUCHI, K., TARNAWSKI, A. (2008). "Gastric Mucosal Defense and Cytoprotection: Bench to Bedside." Gastroenterology **135**: 41-60.

LEHNINGER, A. L., NELSON, D.L., COX, M.M. (2002). "Lehninger: Princípios de Bioquímica. 3. ed." São Paulo: Sarvier.

LIH-BRODY, P., S.R., COLLIER, K.P., REDDY, G.M., CERCHIA, R., KAHN, E., MULLIN, G.E. (1996). "Increase of oxidative stress and decreased antioxidant defenses in mucosa of inflammatory bowel disease." Digestive Disease Science **41**: 2078-2086.

MALFERTHEINER, P., CHAN, F. K. L., MCCOLL, K. E. L. (2009). "Peptic ulcer disease." Lancet **374**: 1449–1461.

MARKLUND, S., MARKLUND, G. (1974). "Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol: a convenient assay for superoxide dismutase enzyme activity." European Journal of Biochemistry **47**: 469–474.

MARTIN, G. R., WALLACE, J. L. (2006). "Repair Gastrointestinal Inflammation: A Central Component of Mucosal Defense " Experimental Biology and Medicine **231**: 130-137.

MATSUI, H., MURATA, Y., KOBAYASHI, F., SHIBA, R., MOMO, K., KONDO, Y., NAKAHARA, A., MUTO, H. (2001). "Diclofenac-induced gastric mucosal fluorescence in rats." Digestive Disease Science **46**: 338–344.

MATSUMOTO, T., SUN, X. B., HANAWA, T., KODAIRA, H., ISHII, K., YAMADA, H. (2002). "Effect of the Antiulcer Polysaccharide Fraction from *Bupleurum falcatum* L. on

the Healing of Gastric Ulcer Induced by Acetic Acid in Rats." Phytotherapy Research **16**: 91-93.

MBEUNKUI, F., GRACE, M. H., LATEGAN, C., SMITH, P. J., RASKIN, I. LILA, M. A. (2011). "Isolation and identification of antiplasmodial N-alkylamides from *Spilanthes acmella* flowers using centrifugal partition chromatography and ESI-IT-TOF-MS." Journal of Chromatography B **879**: 1886-1892.

MOORE K. W., DE WALL MALEFYT, R., COFFMAN R.L., O'GARRA A. (2001). "Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor." Annual Review Immunology **19**: 683–765.

MOWRY, R., WINKLER, C. H. (1956). "The coloration of acidic carbohydrates of bacteria and fungi in tissue sections with special reference to capsules of *Cryptococcus neoformans*, *Pneumococci* and *Staphylococci*." American Journal of Pathology **32**: 628-629.

NAJM, W. I. (2011). "Peptic ulcer disease." Primary Care **38**(3): 383-394.

NASCIMENTO, A. M., SOUZA, L. M. DE., BAGGIO, C.H., WERNER, M. F. DE P., MARIA-FERREIRA, D., SILVA, L. M. DA., SASSAKI, G. L., GORIN, P. A. J., IACOMINI, M., CIPRIANI, T. R. (2012). "Gastroprotective effect and structure of a rhamnogalacturonan from *Acmella oleracea*." Phytochemistry.

NERGARD, C. S., DIALLO, D., INNGJERDINGEN, K., MICHAELSEN, T. E., MATSUMOTO, T., KIYOHARA, H., YAMADA, H., & PAULSEN, B. S. (2005). "Medicinal use of *Cochlospermum tinctorium* in Mali: anti-ulcer-, radical scavenging- and immunomodulating activities of polymers in the aqueous extract of the roots." Journal of Ethnopharmacology **96**: 255-269.

OKABE, S., AMAGASE, K. (2005). "An overview of acetic acid ulcer models: the history and state of the art of peptic ulcer research." Biological & Pharmaceutical Bulletin **28**: 1321–1341.

OKABE, S., ROTH, L.A., PFEIER, J. (1971). "A method of experimental penetrating gastric and duodenal ulcers in rats." American Journal of Digestive Diseases **16**: 277–280.

O'NEILL, A., ISHII, T., ALBERSHEIM, P., DARVILL, A. G. (2004). "Rhamnogalacturonan II: Structure and Function of a Borate Cross-Linked Cell Wall Pectic Polysaccharide Malcolm." Annual Review of Plant Biology **55**: 109–139.

PANDEY, V., CHOPRA, M., AGRAWAL, V. (2001). "In vitro isolation and characterization of biolarvicidal compounds from micropropagated plants of *Spilanthes acmella*." Parasitology Research **108**(2): 297-304.

PHILLIPSON, M., JOHANSSON, M.E.V., HENRIKSNÄS, J., PETERSSON, J., GENDLER, J.S., SANDLER, S., PERSSON, A.E.G., HANSSON, G.C., HOLM, L. (2008). "The gastric mucus layers: constituents and regulation of accumulation." American Journal of Physiology Gastrointestinal Liver Physiology **295**: G806–G812.

PHRUTIVORAPONGKUL, A., CHAIWON, A., VEJABHIKUL, S., NETISINGHA, W. CHANSAKAOW, S. (2008). "An anesthetic alkamide and fixed oil from *Acmella oleracea*." Journal of Health Research **22**: 97-99.

POTRICH, F. B. A., A., DA SILVA, L. M., DOS SANTOS, A. C., BAGGIO, C. H., FREITAS, C. S., MENDES, D. A., ANDRE, E., WERNER, M. F., MARQUES, M. C. (2010). "Antiulcerogenic activity of hydroalcoholic extract of *Achillea millefolium* L.: involvement of the antioxidant system." Journal of Ethnopharmacology **130**(1): 85-92.

PRACHAYASITTIKUL, S., SUPHAPONQ, S., WORACHARTCHEEWAN, A., LAWUNG, R., RUCHIRAWAT, S., PRACHAYASITTIKUL, V. (2009). "Bioactive Metabolites from *Spilanthes acmella* Murr." Molecules **14**: 850–867.

RIDLEY, B. L., O'NEILL, M. A., DEBRA MOHNEN (2001). "Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling." Phytochemistry **57**: 929–967.

RAMAKRISHNAN, K., SALINAS, R. C. (2007). "Peptic Ulcer Disease." American Family Physician **76**.

RAMSEWAK, R. S., ERICKSON, A. J., NAIR, M. G. (1999). "Bioactive N-isobutylamides from the flower buds of *Spilanthes acmella*." Phytochemistry **51**: 729-732.

RATNASOORIYA , W. D., PIERIS, K. P. P., SAMARATUNGA, U., JAYAKODY, J. R. A. C. (2004). "Diuretic activity of *Spilanthes acmella* flowers in rats." Journal of Ethnopharmacology **91**: 317-320.

REPETTO, M. G., LLESUY, S.F. (2002). "Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers." Brazilian Journal of Medical Biological Research **35**(35): 523–534.

ROBERT, A., NEZAMIS, J.E., LANCASTER, C., HAUCHAR, A.J. (1979). "Cytoprotection by prostaglandins in rats: prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl NaOH, hypertonic NaCl and thermal injury." Gastroenterology **77**: 433–443.

ROGLER, G., ANDUS, T. (1998). "Cytokines in inflammatory bowel disease." World Journal of Surgery **22**(4): 382–389.

SANTOS, A. C., BAGGIO, C.H., FREITAS, C. S., LEPIESZYNSKI, J., MAYER, B., TWARDOWSCHY, A., MISSAU, F. C., DOS SANTOS, E. P., PIZZOLATTI, M. G.,

MARQUES, M. C. A. (2008). "Gastroprotective activity of the chloroform extract of the roots from *Arctium lappa* L." Journal of Pharmacy and Pharmacology **60**(6): 795-801.

SCHULTZ, M., DUTTA, S., TEWK. D. (1997). "Inhibitors of glutathione S-transferase as therapeutic agents." Advanced Drug Delivery Reviews **26**: 91-104.

SEDLAK, J., LINDSAY, R. H. (1998). "Estimation of total protein bound and nonprotein sulfhydryl groups in tissues with Ellman's reagent." Analytical Biochemistry **25**.

SHARMA, V., BOONEN, J., CHAUHANA, N. S., THAKUR, M., DE SPIEGELEER, B., DIXITA, V. K. (2011). "*Spilanthes acmella* ethanolic flower extract: LC-MS alkylamide profiling and its effects on sexual behavior in male rats." Phytomedicine **18**: 1161– 1169.

SMIDERLE, F. R., OLSON, L. M., CARBONERO, E. R., MARCON, R., BAGGIO, C. H., FREITAS, C. S., SANTOS, A. R., TORRI, G., GORIN, P. A., IACOMINI, M. (2008). "A 3-O-methylated mannogalactan from *Pleurotus pulmonarius*: structure and antinociceptive effect." Phytochemistry **69**: 2731–2736.

SOUZA-FORMIGONI, M. L., OLIVEIRA, M. G., MONTEIRO, M. G., DA SILVEIRA-FILHO, N. G., BRAZ, S., CARLINI, E. A. (1991). "Antiulcerogenic effects of two *Maytenus* species in laboratory animals." Journal of Ethnopharmacology **34**(34): 21–27.

SRIKANTA, B. M., SATHISHA, U. V., DHARMESH, S. M., (2010). "Alterations of matrix metalloproteinases, gastric mucin and prostaglandin E(2) levels by pectic polysaccharide of swallow root (*Decalepis hamiltonii*) during ulcer healing." Biochimie **92**(2): 194-203.

SRIVASTAVA, R., KULSHVESH, D. K. (1989). "Bioactive polysaccharides from plants." Phytochemistry **28**: 2877-2883.

SUN, S.B., MATSUMOTO, T., YAMADA, H. (1991). "Effect of a polysaccharide fraction from the roots of *Bupleurum falcatum* L. on experimental gastric ulcer models in rats and mice." Journal of Pharmacy and Pharmacology **43**: 699-704.

ŠUTOVSKÁ, M., CAPEKB, P., FRAŇOVÁ, S., PAWLACZYK, I., GANCARZ, R. (2012). "Antitussive and bronchodilatory effects of *Lythrum salicaria* polysaccharide-polyphenolic conjugate." International Journal of Biological Macromolecules **51**(5): 794–799.

SZABO, S., TRIER, J.S., BROWN, A., SCHNOOR, J. (1985). "Early vascular injury and increased vascular permeability in gastric mucosal injury caused by ethanol in the rat." Gastroenterology **88**: 228–236.

TAKEUCHI, K., KAT, S., AMAGASE (2010). "Prostaglandin EP Receptors Involved in Modulating Gastrointestinal Mucosal Integrity." Journal of Pharmacological Science **114**: 248 – 261.

TARNAWSKI A., AHLUWALIA, A., JONES M.K. (2013). "Gastric cytoprotection beyond prostaglandins: cellular and molecular mechanisms of gastroprotective and ulcer healing actions of antacids." Current Pharmaceutical Design **19**(1): 126-132.

TARNAWSKI, A. S., AHLUWALIA, A. (2012). "Molecular mechanisms of epithelial regeneration and neovascularization during healing of gastric and esophageal ulcers." Current Medicinal Chemistry **19**(1): 16-27.

TROOST E., HOLD, G. L., SMITH M.G. (2003). "The role of interleukin-1beta and other potential genetic markers as indicators of gastric cancer risk." Canadian Journal of Gastroenterology **17**: 8B-12B.

TSUKIMI, Y., OKABE, S. (1994). "Validity of kissing gastric ulcers induced in rats for screening of antiulcer drugs." Journal of Gastroenterology and Hepatology **9**: 60-65.

UYANIKOGLU, A., DANALIOGLU, A., AKYUZ, F., ERMIS, F., GULLUOGLU, M., KAPRAN, Y., DEMIR, K., OZDIL, S., BESISIK, F., BOZTAS, G., MUNGAN, Z., KAYMAKOGLU, S. (2010). "Etiological factors of duodenal and gastric ulcers." Turkish Journal of Gastroenterology **23**(2): 99-103.

UYANIKOGLU, A., DANALIOGLU, A., AKYÜZ, F., ERM, F., GÜLLÜOGLU, M., KAPRAN, Y., DEMIR, K., ÖZDİL, S., BOZTAfi, F. B. G., MUNGAN, Z., KAYMAKOGLU, S. (2012). "Etiological factors of duodenal and gastric ulcers. Turkish Journal of Gastroenterology **23**: 99-103.

VILLACHICA, H., CARVALHO, J. E. U., MULLER, C. H., DIAZ, S. C., ALMANZA, M. (1996). "Frutales y hortalizas promissórios de la Amazônia." Lima: TCA; Secretaria Protempore: 322- 327.

WALLACE, J. L. (2008). "Prostaglandins, NSAIDs, and gastric mucosal protection: why doesn't the stomach digest itself?" Physiological Reviews **88**(4): 1547-1565.

WANG, J., FLAISHER-GRINBERGB, S., LIA, S., LIUA, H., SUNA, L., ZHOUA, Y., EINATB, H. (2010). "Antidepressant-like effects of the active acidic polysaccharide portion of ginseng in mice." Journal of Ethnopharmacology **132**(1): 65–69.

WONGSAWATKUL, O., PRACHAYASITTIKUL, S., ISARANKURA-NA-AYUDHYA, C., SATAYAVIVAD, J., RUCHIRAWAT, S., PRACHAYASITTIKUL, V. (2008). "Vasorelaxant and antioxidant activities of *Spilanthes acmella* Murr." International Journal of Molecular Sciences **12**: 2724-2744.

WOUTERSA, M. A., ISSMA, S., FAN, S. W., HAWORTHB, N. L. (2011). "Thiol-based redox signalling: Rust never sleeps." The International Journal of Biochemistry & Cell Biology **43**: 1079– 1085.



WU, L., FAN, N., LIN, M., CHU, I., HUANG, S., HU, C., HAN, S. A. (2008). "Anti-inflammatory effect of spilanthol from *Spilanthes acmella* on murine macrophage by down-regulating LPS-induced inflammatory mediators. ." Journal of agricultural and food chemistry **56**: 2341-2349.

XIAO, C., WU, Q. P., CAI, W., TAN, J. B., YANG, X. B., ZHANG, J. M. (2012). "Hypoglycemic effects of Ganoderma lucidum polysaccharides in type 2 diabetic mice." Archives of Pharmacal Research **35**(10): 1793-1801.

YAMADA, H. (1994). "Pectic polysaccharides from Chinese herbs: structural and biological activity." Carbohydrate Polymers **25**: 269-276.

YAMADA, H. (1995). "Structure and pharmacological activity of pectic polysaccharides from the roots of Bupleurum falcatum L." Nihon Yakurigaku Zasshi **106**(3): 229-237.

YANG, Q., HUANG, B., LI, H., ZHANG, C., ZHANG, R., HUANG, Y., WANG, J. (2012). "Gastroprotective activities of a polysaccharide from the fruiting bodies of *Pleurotus ostreatus* in rats." International Journal of Biological Macromolecules **50**: 1224-1228.

YE, Y. N., SO, H.L., LIU, E.S., SHIN, V.Y., CHO, C.H. (2002). "Effect of polysaccharides from *Angelica sinensis* on gastric ulcer healing." Life Science **72**(8): 925-932.

ZIMMERMAN, B. J., GRISHAM, M. B., GRANGER, D. N. (1988). "Mechanisms of oxidant-mediated microvascular injury following reperfusion of the ischemic intestine." Basic Life Science **49**: 881-886.